



TITLE:

# 腹腔マクロファージレクチンの構造と機能に関する分子生物学的研究( Dissertation\_全文 )

AUTHOR(S):

尾崎, 恵一

---

CITATION:

尾崎, 恵一. 腹腔マクロファージレクチンの構造と機能に関する分子生物学的研究. 京都大学, 1995, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

1995-07-24

URL:

<https://doi.org/10.11501/3105602>

RIGHT:

新 制
薬
164
京大附図

# 腹腔マクロファージレクチンの 構造と機能に関する 分子生物学的研究

1995

尾 崎 恵 一

腹腔マクロファージレクチンの  
構造と機能に関する  
分子生物学的研究

-COS細胞におけるcDNA発現系をもちいて

**1995**

尾 崎 恵 一

# 目次

序論	1
----	---

## 第1章

ラット腹腔マクロファージのガラクトース／N-アセチル ガラクトサミン特異的レクチン(M-ASGP-BP)のアシアロ 糖タンパク質レセプター(ASGP-R)としての機能発現	4
---	---

第1節 M-ASGP-BP cDNAのCOS細胞へのトランスフェクション	6
--------------------------------------	---

第2節 M-ASGP-BP cDNA発現細胞（トランスフォーマント）の性 質	7
---	---

第3節 発現させた組み換え M-ASGP-BPのASGP-Rとしての機能解析	9
--	---

第4節 組み換えM-ASGP-BPの精製とその構造解析	16
-----------------------------	----

考察と総括	20
-------	----

実験方法	25
------	----

## 第2章

ラット腹腔マクロファージのガラクトース／N-アセチル ガラクトサミン特異的レクチン(M-ASGP-BP)のエンド サイトーシスにおける細胞内移行シグナルの解析	29
---	----

第1節 組み換えM-ASGP-BP (rM-ASGP-BP)のN末分析とN末細胞質 領域チロシン(Tyr-5)のリン酸化	29
---	----

第2節 Tyr-5 に対する置換体、欠失体 cDNAの作製と COS細胞への トランスフェクション	32
--	----

第3節 Tyr-5 置換体、欠失体のアシアロ糖タンパク質レセプターと してのエンドサイトーシス活性	33
--	----

第4節 野生体 (wild type) と Tyr-5 欠失体 cDNAの COS 細胞への co-transfection によるエンドサイトーシス活性の評価	37
---	----

考察と総括	39
-------	----

実験方法	45
------	----

### 第3章

ラット腹腔マクロファージのガラクトース／N-アセチル ガラクトサミン特異的レクチン(M-ASGP-BP)の糖鎖結合 特異性の解析（肝レクチンとの比較）	48
---	----

第1節 アグリコン（非糖部分）をもつ単糖による組み換えM-ASGP-BP （rM-ASGP-BP）およびヒト肝癌細胞 Hep G2 細胞に対するアシア ロ糖タンパク質結合阻害実験	49
---	----

第2節 ネオ糖タンパク質による組み換えM-ASGP-BP（rM-ASGP-BP） およびヒト肝癌細胞 Hep G2 細胞 に対するアシアロ糖タンパク 質結合阻害実験	50
--	----

第3節 合成・天然多価糖鎖リガンドによる rM-ASGP-BPおよび Hep G2 細胞に対するアシアロ糖タンパク質結合阻害実験	53
---	----

考察と総括	57
-------	----

実験方法	61
------	----

結論	63
----	----

謝辞	65
----	----

引用文献	66
------	----

## **Chapter 1**

Expression of a Functional Asialoglycoprotein Receptor through Transfection of a Cloned cDNA That Encodes a Macrophage Lectin

Keiichi Ozaki, Masayuki Ii, Nobuyuki Itoh, and Toshisuke Kawasaki

**The Journal of Biological Chemistry , Vol. 267, 9229-9235, 1992**

## **Chapter 2**

Role of Tyrosine-5 in the Cytoplasmic Tail of the Macrophage Asialoglycoprotein Receptor in the Rapid Internalization of Ligands

Keiichi Ozaki, Nobuyuki Itoh, and Toshisuke Kawasaki

**Journal of Biochemistry, Vol. 113, 271-276, 1993**

## **Chapter 3**

The Differences in Structural Specificity for Recognition and Binding between Asialoglycoprotein Receptors of Liver and Macrophages

Keiichi Ozaki, Reiko T. Lee, Yuan C. Lee, and Toshisuke Kawasaki

**Glycoconjugate Journal in press, 1995**

## 序論

近年、タンパク質、核酸に続く第三の分子生物学としての**糖鎖生物学**の重要性が叫ばれている(1)。複合糖質、すなわち糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカンらは生体成分として広く存在している。これらの糖鎖の役割として第一に、糖鎖自身は機能分子ではないが、それらが連結しているタンパク質や脂質の安定化やその機能発現の補助に関係している場合。第二に糖鎖そのものが機能している場合で、細胞間の接着、細胞外マトリックスへの細胞の接着、細胞間認識などの細胞間相互作用を糖鎖が担っているというものである。また、**糖鎖病理学**と言われる新しい研究分野では細胞の癌化や病変に伴う糖鎖の変化を診断するというものである。

さて著者らの研究している(動物)**レクチン**というタンパク質は、当初植物の種より抽出された血球凝集素であり、細菌や動物の体液・組織にも存在しており、特定の糖鎖構造を認識する非免疫性のタンパク質である。従って特定の糖鎖を認識するレクチンは糖鎖研究の有力な手段になりうる。動物レクチンは、糖タンパク質糖鎖の認識による糖特異的なエンドサイトーシス、細胞間認識、生体防御などに関与している。エンドサイトーシスにかかわる分子としての動物レクチンはよく知られており、1974年 G.Ashwellらにより肝実質細胞の類洞面に局在し血液中のアシアロ糖タンパク質(脱シアル化された糖タンパク質)を肝細胞へ取り込むレセプターとしてガラクトースに特異的なレクチン( asialoglycoprotein receptor, ASGP-R )が単離されている(2)。この ASGP-R は肝細胞の障害により肝細胞表面から減少することが知られ、現在臨床的にも正常肝機能の指標とされている(アシアロシンチ)(3,4)。一方、鳥類の肝臓ではこのガラクトースに特異的なレクチンは存在せず、N-アセチルグルコサミンに特異的なレセプターが存在している(5)。また、著者らの研究室においては、マンノースおよびN-アセチルグルコサミンを特異的に認識するレクチン(マンナン結合タンパク質、MBP)をいくつかの動物組織から単離しその諸性質を明らかにしている(6,7,8)。

われわれはラットの腹腔のマクロファージにも肝レクチンに類似するアシアロ糖タンパク質レセプター (macrophage asialoglycoprotein binding protein, M-ASGP-BP) が存在することを見出し、1986年世界に先駆けて単離した(9)。さらに1990年肝レクチンとのホモロジーを利用して、このマクロファージレクチンをコードしていると思われるcDNAのクローニングに成功している(10)。その塩基配列より全アミノ酸配列を決定したところ、ラット肝レクチン (rat hepatic lectin, RHL) の主要成分である RHL-1 と高いアミノ酸相同性をもつことがわかった。肝レクチン RHLは RHL-1 と少数成分 RHL-2/3 からなるヘテロオリゴマーとしての複雑な分子構造をとることが判明しており、糖特異的なエンドサイトーシスレセプターとしての機能についても未だ不明な点も多い。

ところが、我々によって見出されたマクロファージレクチンは肝レクチンによく似た構造をもちながらもよりシンプルな分子構造を持っていると考えられ、エンドサイトーシスレセプターの実験モデルとしても有用であると思われた。そこで、著者はまず単離したマクロファージレクチンをコードしていると考えられる cDNA を SV40 promoter をもつ発現ベクター pdKCR に組み込み、COS-1細胞に導入した。発現したタンパク質を解析することで、この cDNA が M-ASGP-BP をコードしていることを機能的に証明した。また、RHL-1 類似の単独のサブユニットの導入によりアシアロ糖タンパク質レセプター (ASGP-R) の機能発現が可能であることが判明した (11)。これは肝レクチンが ASGP-R として機能しうするためには 2 種類のサブユニットを必要とするのに対して (RHL では RHL-1 と RHL-2/3 (12) および human hepatic lectin (HHL) では HHL-1 と HHL-2 (13))、マクロファージの ASGP-R は単一成分から構成されるホモオリゴマー構造のエンドサイトーシスレセプターとして機能している点で大きく異なっていた。

この発現系による組み換え M-ASGP-BP を用いる利点は、COS 細胞表面には本来のマクロファージ表面の 100 倍以上のレクチンが高発現し強いレクチンシグナルが得られる上、COS 細胞はこのレクチンをもたず発現したレセプターはすべて導入遺伝子の性質を表す点にある。そのため M-ASGP-BP cDNA を COS 細胞に発現させて得られた組み換え M-ASGP-BP について様々な解析をおこなうことが可能になった。

よってこの発現系を用いて糖特異的エンドサイトーシスにおけるレセプターの構造と機能の関連を分子レベルで明らかにするために、レセプターの細胞内移行シグナルに着眼した。最近 LDL レセプターなどのエンドサイトーシスレセプターにおいて細胞内移行シグナルとして細胞質領域のチロシン残基の重要性が見出されている (14)。M-ASGP-BP にも N 末細胞質領域に 1 個のチロシン残基 (Tyr-5) が存在しており、その重要性について検討した。著者はまずこの Tyr-5 がリン酸化されていることを明らかにし、さらに Tyr-5 をアラニン、フェニルアラニンに置換したものと Tyr-5 を欠失させた変異 cDNA を作製した。それらの変異体と wild type のエンドサイトーシス活性を COS 細胞における発現系で比較したところ、欠失体・アラニン置換体ではエンドサイトーシス活性が顕著に減少しており、その効率が低下しているようであった。また、チロシンをフェニルアラニンに置換したものではアラニン置換体ほど効率が低下してはいなかった。以上より細胞質領域 Tyr-5 はレセプターの細胞内移行シグナルとして重要であり、またその働きはある程度フェニルアラニンによっておきかわることから芳香族アミノ酸であることが意味をもつと考えられた (15)。

さらに、M-ASGP-BP は肝レクチンの主要成分 RHL-1 と高いホモロジーを有するが 24 アミノ酸からなる挿入配列をもち、そのサブユニット構造も異なっている。両レクチンは共にガラクトース (Gal)、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に対し特異的ではあるが、その糖鎖結合様式には差異があると考えられたので特異性について検討した。



COS 細胞表面の組み換え M-ASGP-BP およびヒト肝腫瘍細胞株、Hep G2 細胞表面の肝レクチンについて、アシアロオロソムコイド(ASOR)の結合に対する各種阻害物による阻害実験をおこなった。阻害物としてネオ糖タンパク質、価数の異なる合成および天然糖鎖リガンドを用いた結果、M-ASGP-BPも肝レクチンと同様に多価リガンドに強い親和性を持つクラスター効果を示したが、M-ASGP-BPはGalに、肝レクチンはGalNAcにより特異的であった。また、両者の認識する糖の空間配置についても相違点がみられ、M-ASGP-BPは肝レクチンに比べ柔軟に糖鎖を認識できると考えられた(16)。

以上、著者はCOS細胞におけるcDNA発現系を用いレクチンシグナルを増強することで、ラット腹腔マクロファージに見出されたアシアロ糖タンパク質レセプターとしてのレクチン、M-ASGP-BPの構造と機能の関係を明らかにした。また、肝レクチンとの相違点を明らかにすることにより、生体防御の中心をなす貪食細胞マクロファージの機能と動物レクチンとの関連を知る上で重要な知見を得た。

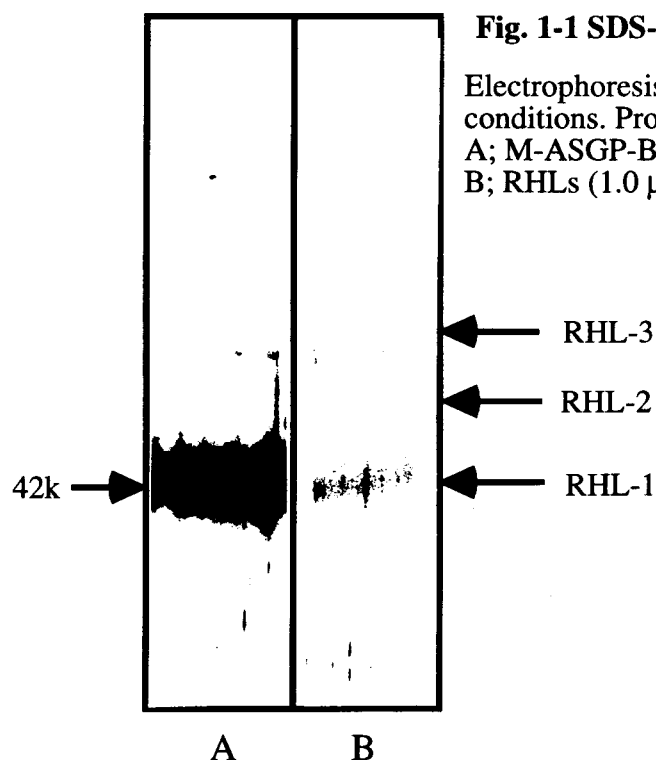
以下、これらの知見について論述する。

## 第1章

### ラット腹腔マクロファージのガラクトース／N-アセチルガラクトサミン特異的レクチン (M-ASGP-BP) のアシアロ糖タンパク質レセプター (ASGP-R) としての機能発現

著者らの研究室では、ラットの腹腔マクロファージがアシアロ糖タンパク質を特異的に取り込むことを初めて見出し、腹腔マクロファージからガラクトース (Gal) / N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 特異的レクチン (macrophage asialoglycoprotein binding protein, M-ASGP-BP) を単離・精製した (SDS-PAGE では 42kDa, Fig.1-1 A) (17)。アシアロ糖タンパク質レセプター (ASGP-R) としてよく知られているラット肝レクチン (rat hepatic lectin, RHL) は Fig.1-1 B に示すように、主要成分 RHL-1 (42kDa) と少数成分である RHL-2/3 (RHL-2 (49kDa) と RHL-3 (54kDa) はポリペプチド部分は同じで付加している糖鎖部分が異なる) よりなるヘテロオリゴマーとして機能することが知られている。1990年、M-ASGP-BP が RHL-1 と構造類似性をもつことを利用して cDNA のクローニングに成功した (Fig.1-2) (10)。その塩基配列より全アミノ酸配列が明らかになり、M-ASGP-BP は 306 アミノ酸 (分子量 34,242 と計算された) よりなる糖タンパク質であり、RHL-1 と高い相同性を示し、RHL-2/3 よりも RHL-1 の方により類似したタンパク質であることが判明した (Fig.1-3)。

第1章では、単離した cDNA が真に M-ASGP-BP をコードしていることを機能的に証明し、かつ M-ASGP-BP の ASGP-R としての働きを明らかにする目的で、この cDNA を COS 細胞に導入することによって、発現したタンパク質を免疫化学的、タンパク質化学的に調べるとともにその機能を解析した。



**Fig. 1-1 SDS-PAGE of isolated ASGP-R**

Electrophoresis was carried out under reducing conditions. Protein was visualized by silver staining.  
A; M-ASGP-BP (1.7 µg)  
B; RHLs (1.0 µg)

**Fig.1-2 Nucleotide sequence of the M-ASGP-BP cDNA and deduced amino acid sequence.**

The deduced amino acid sequence is shown, using the standard one-letter code, below the nucleotide sequence. The N-terminus residue of the mature protein and potential N-glycosylation sites are indicated by the closed- and open triangles, respectively. Amino acid residues determined with the protein sequencer are underlined. The polyadenylation signal is boxed. The RGD sequence is indicated by the broken underlining.

```

CCACCTCTGGCCACTGCTGCACAGGGAAGCCAGTATTCACAGTTCAGGACTTACCT    60
CAGCTTCACACTGCTCTGACACTCTCCTTGGTCCCAGCTCAGTATCTGTCTGGATTCTG    120
GTGCTCGGTTTCAGTTTCAGATAGCCCTAGAGGCTTGTGTTTGTGCAAGCATGACAATG    180
                                     M T M
GCATATGAAACCTTCAGAACTTGGGGAGCGAAGAGAAAAACCAAGAGGCTGTTAAAGCT    240
A Y E N F Q N L G S E E K N Q E A G K A
CCTCCCAGTCTCTCTGTGCAATATCTCTCTTGGACCCACCTCTCTCTCTCTCTCTCTG    300
P P Q S F L C N I L S W T H L L L F S L
GGCCTTAGCCTCCTGCTGCTGGTGGTTATCTCCGTGATTGGATCCCAAATTCAGTTA    360
G L S L L L L V V J S V I G S Q N S Q L
AGGAGGGACCTAGAAACCTGAGAACCACTTTAGACAAACACCTCCAACCAAGGCT    420
R R D L E T L R T T T L D N T T S N T K A
GAACTACAGGCCCTGGCCTCCAGGGGTGACAGCTTGCAACAGGAATCAATTCTGAAA    480
E L Q A L A S R G D S L Q T G I N S L K
GTGGAGGTGGATGATCATGGGACGAACTGCAGGCGAGGCGAGGCTTGAGCCAGAAGTG    540
V E V D D H G Q Q E L Q A G R G L S Q K P L
GCTTCTCTGGAGGACAGTGGAGAGAAGGAGCAGACTCTCAGAACAGATCTATCTGAA    600
A S L E S T V E K K E Q T L R T D L S E
ATAACCGTCTGCTGGCAACAGCTGGGGAAGGACTTGAAGACCTGCATGTCAGCTGGCC    660
I T D R V Q Q L G K D L K T L T C Q L A
AGCCTCAAGAACACGGCTCAGCAGTGGCCTGCTGCCCTTCACTGGATGGAGCATGAA    720
S L K N N G S A V A C C P L H W M E H E
GGCAGCTGCTGCTGCTCTCTCAGTCTGGGAAGCCGTGGCCTGAAGCTGACAAGTACTGC    780
G S C Y W F S Q S G K P W P E A D K Y C
CAGCTGGAGAACTTCAACCTAGTGGTGGTCAACTCCCTGGCGGAGCAGAATTTTCTACAG    840
Q L E N S N L V V V N S L A E Q N F L Q
ACTCACATGGGACGCTGGTCACTTGGATTGGCCTAACGGACCAAAATGGGCGCTGGCGA    900
T H M G S V V T W I G L T D Q N G P W R
TGGGTGGAGCGGACCGACTATGAGAAAGGCTTTAGCAGCTGGGCCCCAAGCAGCCAGAT    960
W V D G T D Y E K G F T H W A P K Q P D
AACTGGTATGGACACGGGCTGGGAGGAGGCGAGGACTGTGCACACTTCACTCAGATGGT    1020
N W Y G H G L G G G E D C A H F T S D G
CGCTGGAATGATGACGTTTGCCAGAGGCCCTACCGCTGGGTCTGTGAGATGAAGCTGGCC    1080
R W N D D V C Q R P Y R W V C E M K L A
AAGGACAGCTAGGAGCACTCTCAAGTAATTTATTTCTCAGTGGTTTTATGCTGGGGAAG    1140
K D S
CCTGGAGTTTGGACTCCTCTATCCCATTTCAATGTTATTTGGGACTTTTCTTTTGTCA    1200
AAAAATTTAAGTCAAGGAGAAAGGATTGTGTTTGAGATGGTAGTGTGGTGTCCGGAAGAA    1260
TGGGGTTATTGAAATCTGTGGTATTTTGTACAGAGTGCCGCTTATTGTAGGACTTTTAA    1320
TGTAACAAATATAATACTGTTGGTTTTAAAAAAAC    1358

```

**Fig.1-3 Comparison of M-ASGP-BP and RHLs**

Dashes represent gaps introduced to optimized the alignment. Identical residues in M-ASGP-BP and the RHLs are boxed, and asterisks indicate amino acid residues which are conserved in the CRDs. An arrow head indicates the N-terminus of the mature M-ASGP-BP.

```

      1
(M)T M A Y E N F Q N L G S E E K N Q E A G - - - - - M-ASGP-BP
(M)T K D Y Q D F Q H L D N E C N D H H Q L - - - - - RHL-1
(M)E K D F Q D T L Q Q L D S E E N D H Q L I G D E E Q G S H V RHL-2/3

- - - - - K A P P Q S F - L C N I L - S W T H L L M-ASGP-BP
- - - - - Q R G P P P A P R L L Q R L C S G F R L F RHL-1
Q N L R T E N P R W G Q P P S R P F P Q R L C S K F R L S RHL-2/3

L F S L G L S I L L L L V V I S V I G S Q N S Q L R R D L E T M-ASGP-BP
L L S L G L S I L L L L V V I C V I T S Q N S Q L R E D L R V RHL-1
L L A L A F N I L L L L V V I C V V S S Q S H Q L Q K E F W T RHL-2/3

L R T T L D N T T S N T K A E L Q A L A S R G D S L Q T G I M-ASGP-BP
L R Q N F S N T T I V S T E D Q V K A L T T Q - - - - - RHL-1
L K E T L S N F S T T L M E F K A L D S H - - - - - RHL-2/3

N S L K V E V D D H G Q E L Q A G R G L S Q R V A S L E S T M-ASGP-BP
- - - - - G E R V G R K M K L V E S I Q RHL-1
- - - - - G G S R N D N L T S W E T I RHL-2/3

V E K K E Q T L R T D L S E I T D R V Q Q L G K D L K T L T M-ASGP-BP
L E K K H Q E D L R E D H S R L L L H V K Q L V S D V R S L S RHL-1
L E K K Q K D I K A D R S T L L F H L K H F P L D L A T L T RHL-2/3

C Q L A S L K N N G S A V A C C P L H W M E H E G S C Y W F M-ASGP-BP
C Q M A L R G N G S E R I C C P I N W V E V E G S C Y W F RHL-1
C Q L A F F L S N G T E - C C P V N W V E F O G S C Y W F RHL-2/3

S Q S G K P W P E A D K Y C Q L E N S N L V V V N S L A E Q M-ASGP-BP
S S S V K P W T E A D K Y C Q L E N A H L V V V T S W E E Q RHL-1
S R D G L T W A E A D Q Y C Q M E I A H L L V T N S R E E Q RHL-2/3

N F L Q T H M G S V V T W I G L T D Q N G P W R W V D G T D M-ASGP-BP
R F V Q Q H M G P L N T W I G L T D Q N G P W R W V D G T D RHL-1
E F V K H R G A F H T W I L T D Q N G P W R W V D G T E RHL-2/3

Y E K G F T H W A P K Q P D N W Y G H G L G G G E D C A H F M-ASGP-BP
Y E T G F K N W R P G Q P D W Y G H G L G G G E D C A H F RHL-1
Y R S N F K N W A F T Q P D N C Q G H E E G S E D C A E I RHL-2/3

T S D G R W N D D V C Q R P Y R W V C E N K L A K D S M-ASGP-BP
T T D G H W N D D V C R P Y R W V C E T E L K A N RHL-1
L S D G L L N D N F C Q V N R W A L C S R K R D I T Y RHL-2/3

```

## 第1節 M-ASGP-BP cDNA の COS 細胞へのトランスフェクション

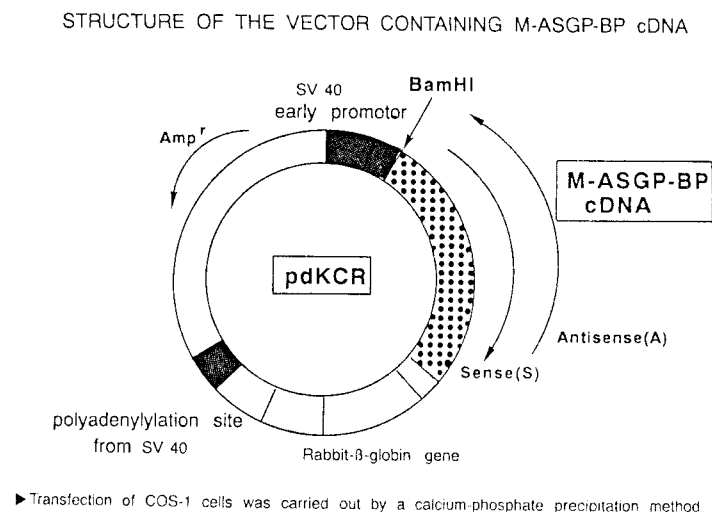
### 1、発現ベクター pdKCR-M-ASGP-BP の構築

COS-1 細胞での発現には動物細胞用発現ベクター pdKCR (18,19)を用いた。この pdKCR は Fig.1-4 の様にSV 40 由来の promoter と poly (A) 付加シグナルをもち、full-length のM-ASGP-BP cDNAクローンを SV 40 promoter 下流に組み込み、5' ➡ 3' の正方向に入ったものを sense (これをトランスフェクションした細胞をT(S)細胞)とし、その逆方向に入ったものを antisense (トランスフェクションした細胞をT(A)細胞)として後者をコントロールに用いた。

### 2、リン酸カルシウム共沈法によるトランスフェクション

上記の様に構築した発現ベクターを塩化セシウム密度勾配法により2回精製した後、リン酸カルシウム法により COS-1 細胞にトランスフェクションした(20,21)。以下の実験には、トランスフェクション後 48～72 時間の細胞を用いている。

**Fig.1-4 Construction of the Expression Vector, pdKCR-M-ASGP-BP**



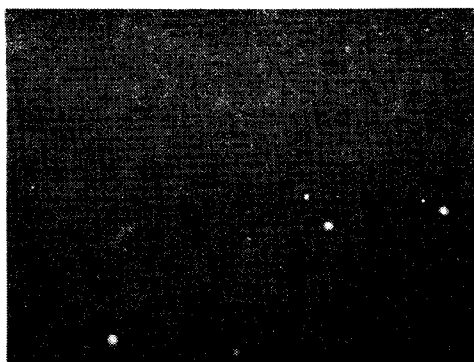
## 第2節 M-ASGP-BP cDNA 発現細胞（トランスフォーマント）の性質

### 1、免疫化学的性質

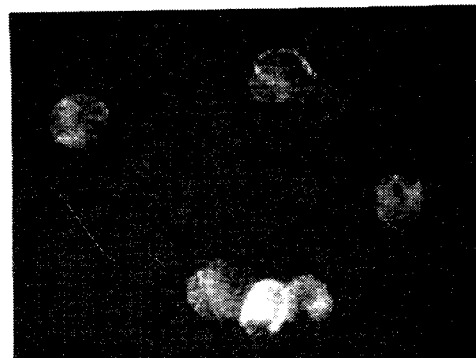
まず第一に、発現の有無を免疫化学的に調べるためにM-ASGP-BP と交差反応することがわかっているラット肝臓のアシアロ糖タンパク質レセプター (RHL) に対する抗体 (9,17)を用いて間接蛍光抗体法により FITC 染色した。Fig.1-5 A に見られる様にラット腹腔マクロファージ表面のレクチンが染色されたことから、antisense plasmid を導入したT(A) 細胞とsense plasmidを導入した T(S)細胞の両トランスフォーマントについて、同様のことを行った。まず Bに見られるようにT(S)細胞ではよく染まっており、そのシグナルはマクロファージ表面より強く、細胞表面 および核周辺部が特異的に染色されていた。一方、C の T(A)細胞では抗 RHL 抗体による特異的な染色は認められなかった。従って、T(S) 細胞においてのみ免疫原性の類似したタンパク質の発現が確認された。

**Fig.1-5 Immunostaining with the anti-RHL antibody**

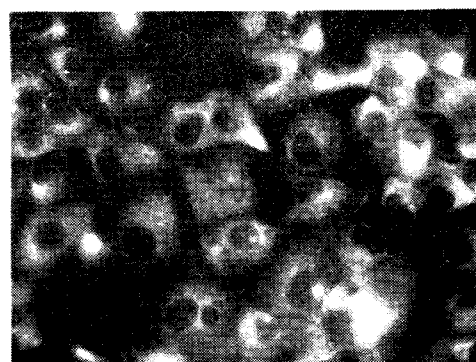
Indirect immunofluorescence staining was performed as described under "Experimental Procedures." Panel A shows rat peritoneal macrophages expressing M-ASGP-BP (x1000). Panels B and C show COS-1 cells transfected with sense M-ASGP-BP cDNA (T (S) cells) and antisense cDNA (T(A) cells), respectively.(x400). Panel C is a negative control.



C



A



B

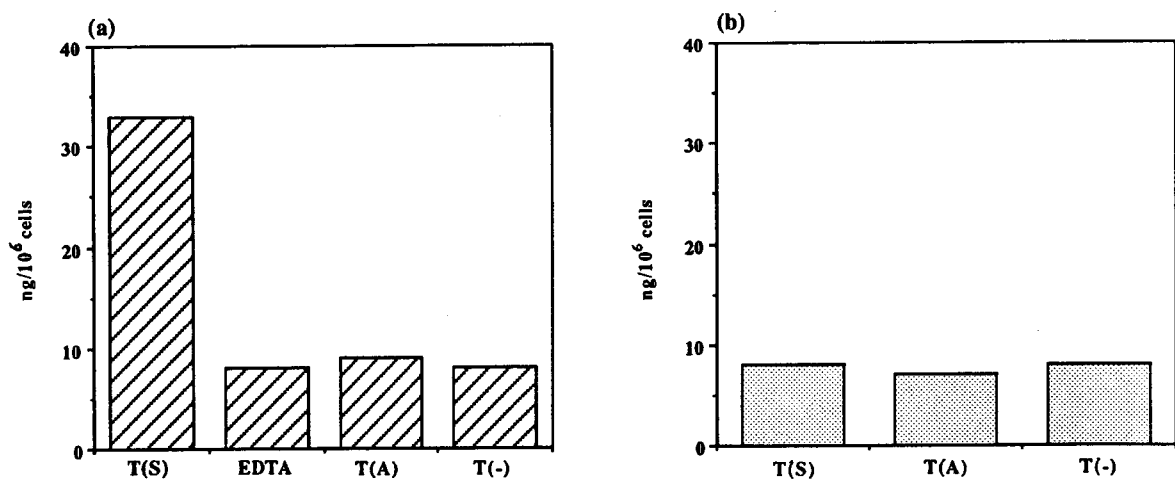
## 2、レクチン活性

次に発現したタンパク質の機能を調べるために、ASGP-Rのアシアロ糖タンパク質リガンドとしてよく用いられるアシアロオロソムコイド(ASOR)を $^{125}\text{I}$ ラベルした $^{125}\text{I}$ -ASORと各細胞を $37^\circ\text{C}$ 、20分間 incubation した。以下の実験では、細胞に關与する放射活性(cpm)を比活性(cpm/ng)により ASOR 量(ng)として評価している。結果は、Fig.1-6 (a) に見られるようにT(S)細胞では $10^6$ 細胞あたり、33ngのASORを取り込んだ。この値はトランスフェクションしていないCOS-1細胞T(-)やT(A)細胞の3倍以上であり、またT(S)細胞を5mM EDTA存在下でincubationした時の値はT(-)やT(A)細胞のレベルに下がる。これは、M-ASGP-BPが $\text{Ca}^{2+}$ 依存性のレクチン(Cタイプレクチン)であることを反映している。以上のことより、T(S)細胞は特異的にASORを取り込んでいることがわかった。

一方、Fig.1-6 (b) は $^{125}\text{I}$ -mannan をリガンドとした場合でいずれの細胞も特異的な取り込みを示さなかった。このことは、マクロファージにはASGP-Rの他にマンノースレセプターの存在も知られているが(22)、発現したタンパク質はこれとは性質を異にするものであることを示している。以上より、T(S)細胞表面にはM-ASGP-BPと免疫原性の類似したレクチンが発現していることが示された。

**Fig.1-6 Uptake of glycoproteins by transfected cells**

T(S),T(A), and T(-) cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 20min with (a) ASOR and (b) mannan in the absence or presence of 5mM EDTA(EDTA).



### 第3節 発現させた組み換えM-ASGP-BPのASGP-Rとしての機能解析

1、リガンドのT(S)細胞表面への結合 (Binding)、細胞内移行 (Internalization)、そして分解 (Degradation) (エンドサイトーシス型レセプターとして)

(a) リガンド ( $^{125}\text{I}$ -ASOR)のT(S)細胞表面への結合 (Binding) および細胞内移行 (Internalization)

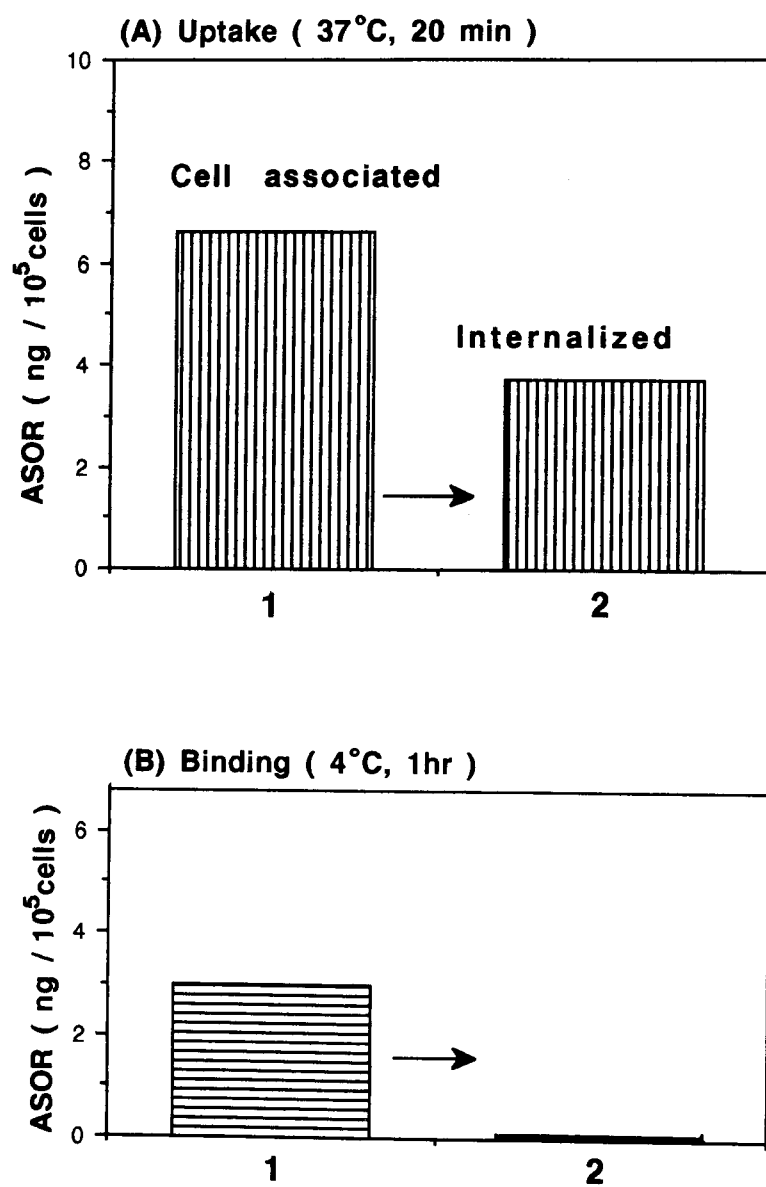
第2節に示したように、T(S)細胞によって特異的にASORは取り込まれることがわかった。しかし、リガンドはまず第一に細胞表面レセプターに結合し、その後レセプターと共に細胞内へ取り込まれ (エンドサイトーシス)、分解される。つまり、前述の取り込み (cell-associated) は分解物を無視すれば、細胞表面結合量と細胞内移行量の総和を意味する。

実際にどの程度のASORが細胞内移行 (internalized) しているのかを評価した。あらかじめ $^{125}\text{I}$ -ASORとT(S)細胞をincubationしておき、その後5 mM EDTAを含むPBSで細胞を洗浄する(EDTA-stripped)。レクチンとリガンドの結合は $\text{Ca}^{2+}$ 依存性であるため、このEDTA処理によって細胞表面に結合したASORは速やかに遊離する(23)。Fig.1-7(A)に示すように、cell-associated ASOR量の約40%がEDTAによって遊離し、またこの遊離量は(B)にしめす細胞表面結合量にほぼ一致する。従って、EDTA処理後に残ったASORは細胞内にinternalizedされていると考えられる。(B)のASOR表面結合量は、ASORとともに4°C、1時間 (リガンドが細胞内にエンドサイトーシスされない条件)でincubationすることによって決定し、EDTAで洗浄すると完全に消失する。これらの結果から、37°CにおいてT(S)細胞表面に結合した $^{125}\text{I}$ -ASORはその後、急速にinternalizationされることがわかる。

#### **Fig. 1-7 Specific uptake and internalization of $^{125}\text{I}$ -ASOR by transfected COS-1 cells.**

T(S) cells ( $1 \times 10^5$ ) were incubated with 2  $\mu\text{g}$  of  $^{125}\text{I}$ -ASOR at 37°C for 20 min (A) or 4 °C for 60 min (B). The cells were washed with PBS (1) or 5 mM EDTA in PBS (2) as described under "Experimental Procedures." A-1 shows the specific uptake at 37 °C: the total associated  $^{125}\text{I}$ -ASOR; and B-1 shows the specific binding at 4 °C: the total cell surface-bound  $^{125}\text{I}$ -ASOR. A-2 represents the amount of internalized  $^{125}\text{I}$ -ASOR.

**Fig. 1-7**





(b) 細胞内移行後の ASOR の分解 (degradation)

レセプターを媒介として細胞内に取り込まれたリガンドは、通常 lysosome に運ばれ分解され、分解産物は細胞外へと放出される。発現させたタンパク質が T(S) 細胞において ASGP-R として正常に機能しているかを調べるため、ASOR 分解産物の測定を行った。T(S)細胞に  $^{125}\text{I}$ -ASOR を加え  $4^{\circ}\text{C}$ 、1 時間でリガンドを結合させ、氷冷した medium で洗浄後、 $37^{\circ}\text{C}$  での 5 から 120 分までの各 incubation 時間において medium 中の酸可溶性画分の放射活性を測定しこれを分解産物に關与するカウントとしてモニターした (24)。一方で、 $4^{\circ}\text{C}$ 、1 時間 incubation 後 EDTA で遊離させた ASOR の細胞表面結合量のカウントを 100% として、各 incubation 時間において medium 中に放出された ASOR の割合を Fig.1-8 に示している。 $^{125}\text{I}$ -ASOR と共に  $4^{\circ}\text{C}$  で incubation した T(S)細胞を  $37^{\circ}\text{C}$  に移すと、細胞表面結合リガンドはエンドサイトーシスされ、分解産物として medium 中へ放出される。酸可溶性放射活性は最初の 10~20 分間は非常に低レベルであり、その後急速に上昇する。 $37^{\circ}\text{C}$ 、90 分までで、前もって結合させた ASOR のカウントの約 70% が放出される。以前行ったマクロファージについての同様の実験では 20~30 分後から分解産物の放出が確認されており、組み換え体においてもほぼ同様の結果が得られたといえる。従って、組み換え M-ASGP-BP (rM-ASGP-BP) を介して細胞内にエンドサイトーシスされた ASOR はおそらく lysosomal compartment において分解を受け、細胞外に放出されることがわかった。すなわち、rM-ASGP-BP はエンドサイトーシスレセプターとして機能していることが証明された。

**Fig. 1-8 Degradation of  $^{125}\text{I}$ -ASOR by T(S) cells.** Transfected COS-1 cells ( $1 \times 10^5$ /35-mm well) were incubated with  $^{125}\text{I}$ -ASOR at  $4^{\circ}\text{C}$  for 1h to saturate the surface receptor. After washing, the cells were warmed by the addition of serum-free medium at  $37^{\circ}\text{C}$  and then incubated in a  $\text{CO}_2$  incubator at  $37^{\circ}\text{C}$ . At the time indicated, the amount of acid-soluble radioactivity in the medium was determined as described under "Experimental Procedures." The amounts of  $^{125}\text{I}$ -ASOR degraded are plotted as percentages of the amount of the ligand specifically bound to the cell surface. Closed circles represent the averages for four experiments.

Fig. 1-8

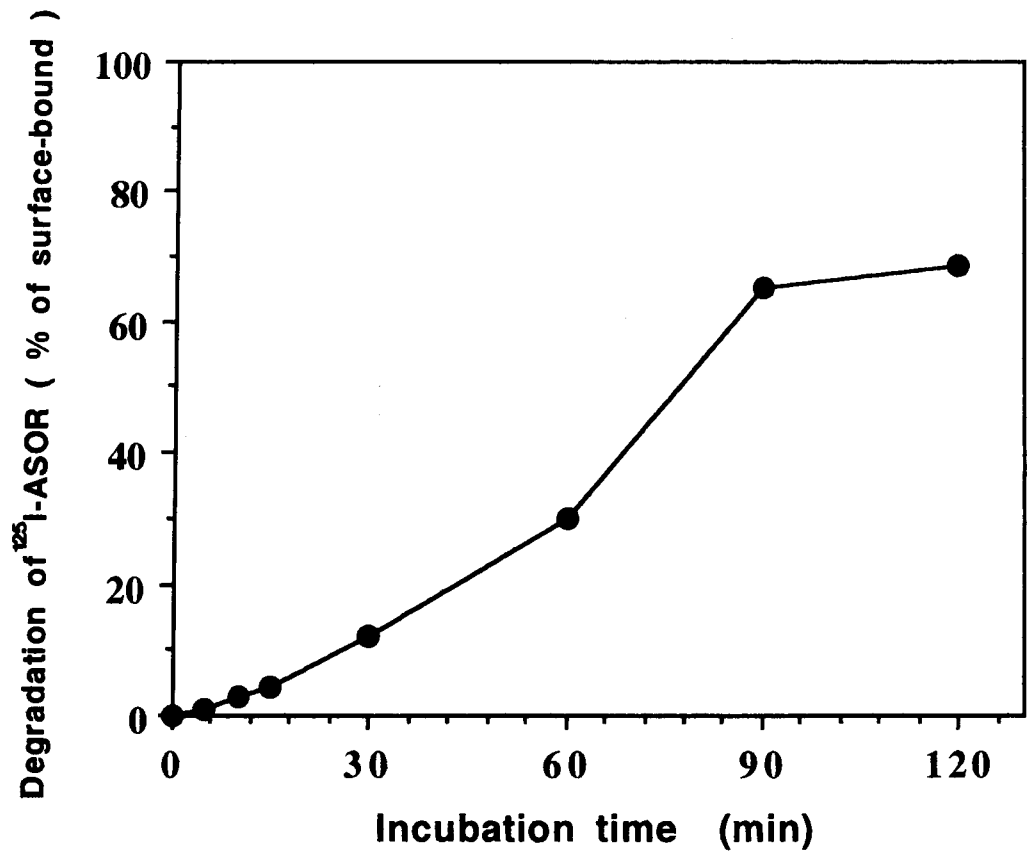
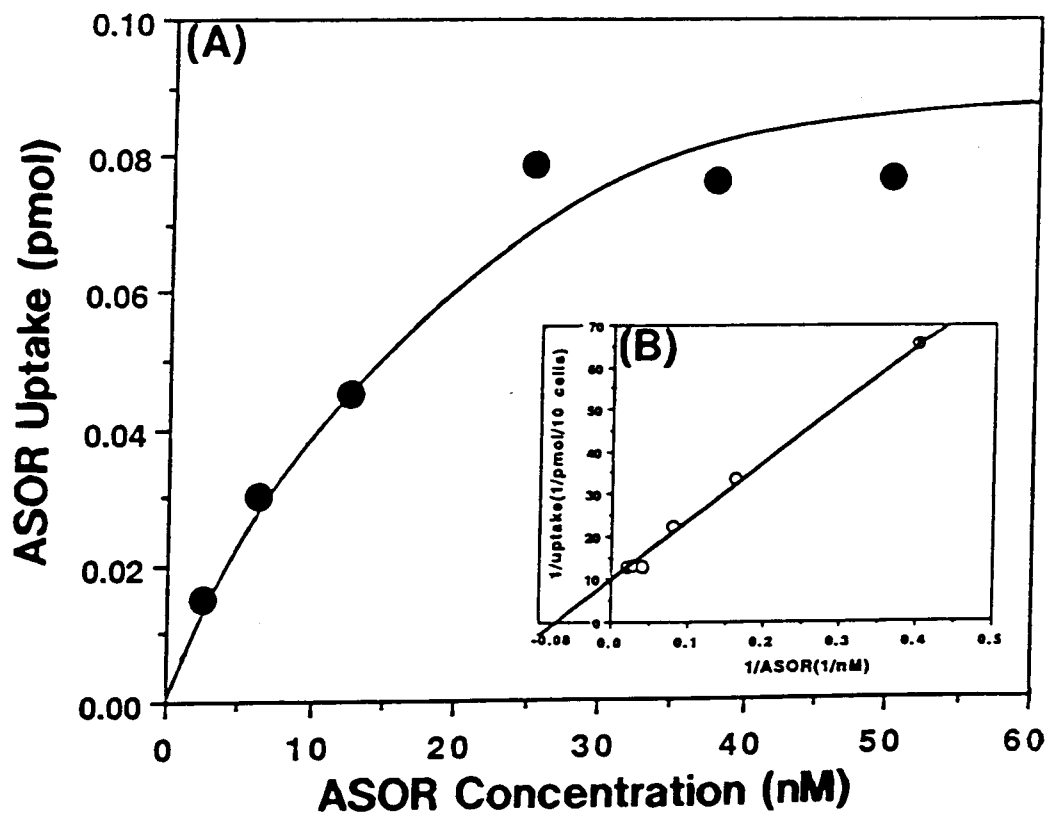


Fig. 1-9



**Fig. 1-9 Estimation of  $K_{\text{uptake}}$  for ASOR in transfected COS-1 cells.** T(S) cells ( $1 \times 10^5$ ) were incubated for 20 min at 37 °C with various concentrations (2.5-50 nM) of  $^{125}\text{I}$ -ASOR as described under "Experimental Procedures." A shows the saturation uptake of  $^{125}\text{I}$ -ASOR by T(S) cells as a function of the ASOR concentration in the medium. The specific uptake was determined as difference between the total and the nonspecific uptake. The inset (B) shows the results of Lineweaver-Burke analysis of these data. The  $K_{\text{uptake}}$  value for ASOR in T(S) cells calculated from the data is 12.5 nM.

## 2、リガンド親和性

rM-ASGP-BP を介したT(S) 細胞への $^{125}\text{I}$ -ASOR の取り込み( cell-associated) に対する親和性を評価した。Fig.1-9 (A) に示すように、横軸の $^{125}\text{I}$ -ASOR濃度の増大にともない、縦軸にモル数であらわした $^{125}\text{I}$ -ASORの取り込みも増大しやがて飽和する。

これを、(B) に示す Lineweaver-Burke 型プロットにより解析すると直線となることからT(S) 細胞におけるASOR の binding site はsingle class であり、取り込みの親和定数 ( $K_{\text{uptake}}$ ) は12.5 nM と計算された。この値は、マクロファージ本来のもので23 nM、肝細胞 ASGP-R (RHL) で 10 nM とすでに明らかにされている値 (9, 25) と非常に類似しており親和性の高い取り込みであるといえる。つまり、M-ASGP-BP cDNA のコードするタンパク質単独で高い親和性をもったマクロファージ 本来の ASGP-Rとしての機能を果たせることがわかった。さらに、1モルのASOR が1モルのASGP-Rに結合すると仮定すると、T(S) 細胞は ASGP-Rを  $1.8 \times 10^5$  / cell だけ発現していることになる。この数は腹腔マクロファージ ( $1 \times 10^3$  / cell) の100倍以上であり、肝細胞 ( $1.5 \times 10^5$  / cell) に近いものである(9, 25)。従って、肝レクチンに比べると細胞表面に非常に少ないマクロファージレクチン数を肝細胞レベルまでに増幅することに成功したといえる。

### 3、リガンド特異性

血清中の糖タンパク質の糖鎖はほとんどが複合型糖鎖からなり、シアル酸-ガラクトース (Gal) -N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) という末端構造をもつ。そして、この糖鎖からシアル酸がはずれ、末端にGalが突出したアシアロ糖タンパク質が肝臓のASGP-Rにとりこまれる。

M-ASGP-BPも肝レクチンと類似した糖特異性を示し、GalおよびN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 特異的である。T(S)細胞に発現したrM-ASGP-BPはアシアロ糖タンパク質であるASORを特異的に取り込んだが、さらに詳細に糖特異性を検討した。すなわち、T(S)細胞に対して各種阻害物存在下、 $^{125}\text{I}$ -ASORの取り込み阻害実験を行った。

Fig.1-10 (A)では、ラベルしたASORに対して50モル過剰の糖タンパク質による、阻害実験の結果を示している。末端にL-フコース(L-Fuc)、GlcNAc、マンノース(Man)をもったBSA (neoglycoprotein) すなわち、L-Fuc-BSA、GlcNAc-BSA、Man-BSA および末端にシアル酸のついたままのオソムコイド(OR)では特異的な阻害はみられない。一方、同モルのGal-BSAやラベルしていないASORはT(S)細胞による $^{125}\text{I}$ -ASORの取り込みをそれぞれ95% および90% 阻害した。

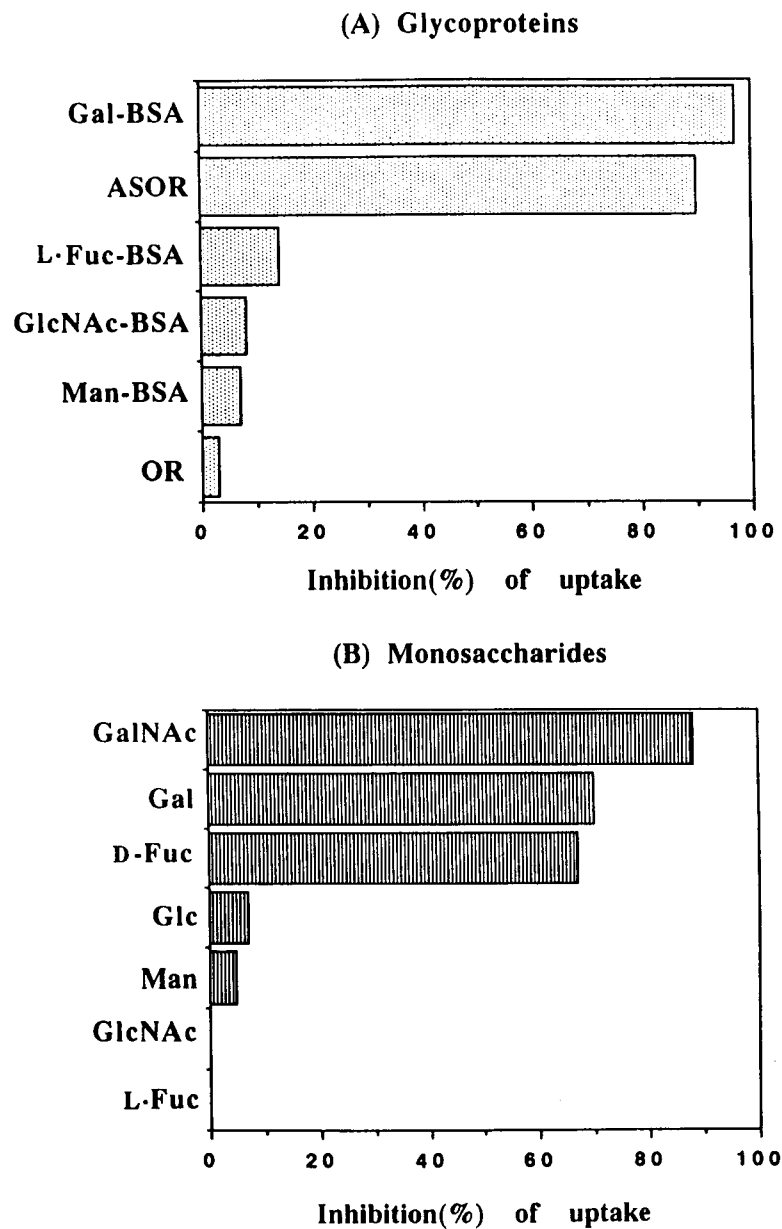
また、Fig.1-10 (B)では20 mM 単糖存在下での阻害実験の結果を示している。単糖のレベルでもGalNAc、Gal 特異的なレクチンとしての性質を示した。ところで、D-Fucでも阻害が見られるが、これはD-6-デオキシガラクトースのことでD-Galに構造が類似しているためと考えられる。この結果は、GalのC6位を修飾してもRHLに対してその結合活性は変わらないという報告(26, 27)にも矛盾していない。一方、動物に通常見られるL-Fucでは阻害がかかってはいない。

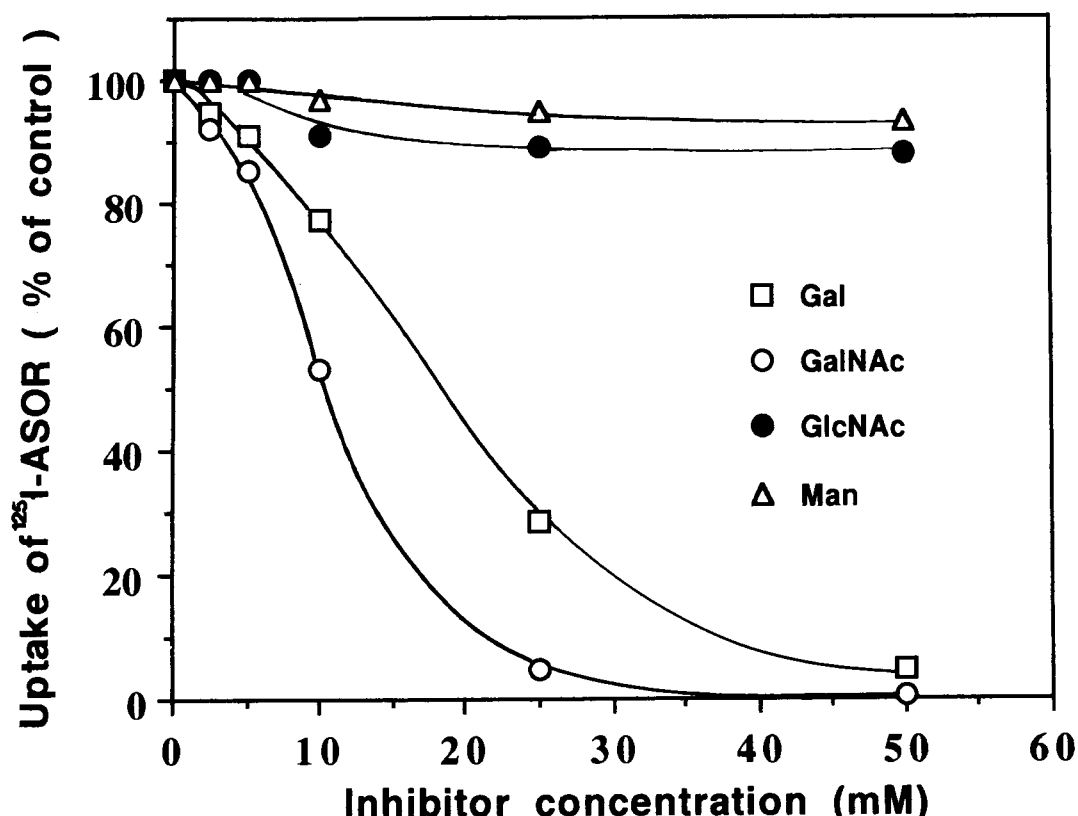
さらに、Fig.1-11に示す単糖の濃度依存的な取り込み阻害実験によると、 $^{125}\text{I}$ -ASORの取り込みを50%阻害する濃度( $I_{50}$ )はGal、GalNAcでそれぞれ17 mM、10 mMとなった。この値は、マクロファージレクチンでのGalNAcの $I_{50}$  (9 mM) に類似している(9)。

以上これらすべての結果は、T(S)細胞がまぎれもなくGal/GalNAc 特異的なマクロファージレクチンを発現していることを示している。

**Fig.1-10 Sugar Specificity of rM-ASGP-BP.**

T(S) cells were incubated with  $^{125}\text{I}$ -ASOR in the presence of (A) glycoproteins (50-fold molar excess) or (B) monosaccharides (20 mM). Control uptake was measured under the same conditions in the absence of added inhibitors.





**Fig.1-11 Specificity of  $^{125}\text{I}$ -ASOR uptake by T(S) cells.** T(S) cells were incubated with  $^{125}\text{I}$ -ASOR in the presence or absence of various concentrations of monosaccharides. The amount of uptake was estimated as described under "Experimental Procedures".

#### 第4節 組み換えM-ASGP-BPの精製とその構造解析

COS-1細胞で発現させた rM-ASGP-BP をタンパク質化学的に調べるため、免疫沈降、および affinity chromatography によって発現したタンパク質を精製した。また、ゲルろ過することで、オリゴマー構造形成時のレクチンの分子量について分析した。

##### 1、免疫沈降によるrM-ASGP-BPの同定

トランスフェクションした細胞に発現している rM-ASGP-BP を  $[^{35}\text{S}]$ -メチオニン (Met) 及びシステイン (Cys) でラベルし、免疫沈降によって分離した。

すなわち、トランスフェクションして60時間後、細胞を  $[^{35}\text{S}]$ -アミノ酸で2時間ラベルし Triton X-100 で可溶化した。その可溶化物を RHL-1 に対する抗血清 (M-ASGP-BP と交差反応する) で免疫沈降し、SDS-PAGE によって分離し fluorography でバンドを検出した。T(S)細胞からの免疫沈降物では、rM-ASGP-BP として約40 kDa、42k Daに相当するややbroadな2本のバンドが見られた。一方、T(A)細胞では、この2本のバンドは検出されなかった。(Fig.1-12, (a) lane A と B)

Fig.1-1( lane A) で示したように、マクロファージから精製したM-ASGP-BP の見かけの分子量は、SDS-PAGE では42 kDa と計算された(9)。従って、ほぼ同様の分子量の rM-ASGP-BPがCOS 細胞で発現していたが、その分子量には多様性が見られた。M-ASGP-BP (306アミノ酸、分子量 34,242)は N-glycoside 型糖鎖の結合部位が2箇所存在する糖タンパク質である(Fig.1-2) (10)。よって、その分子量の多様性は付加している糖鎖によるものであると考えられたことから、次の実験にすすんだ。

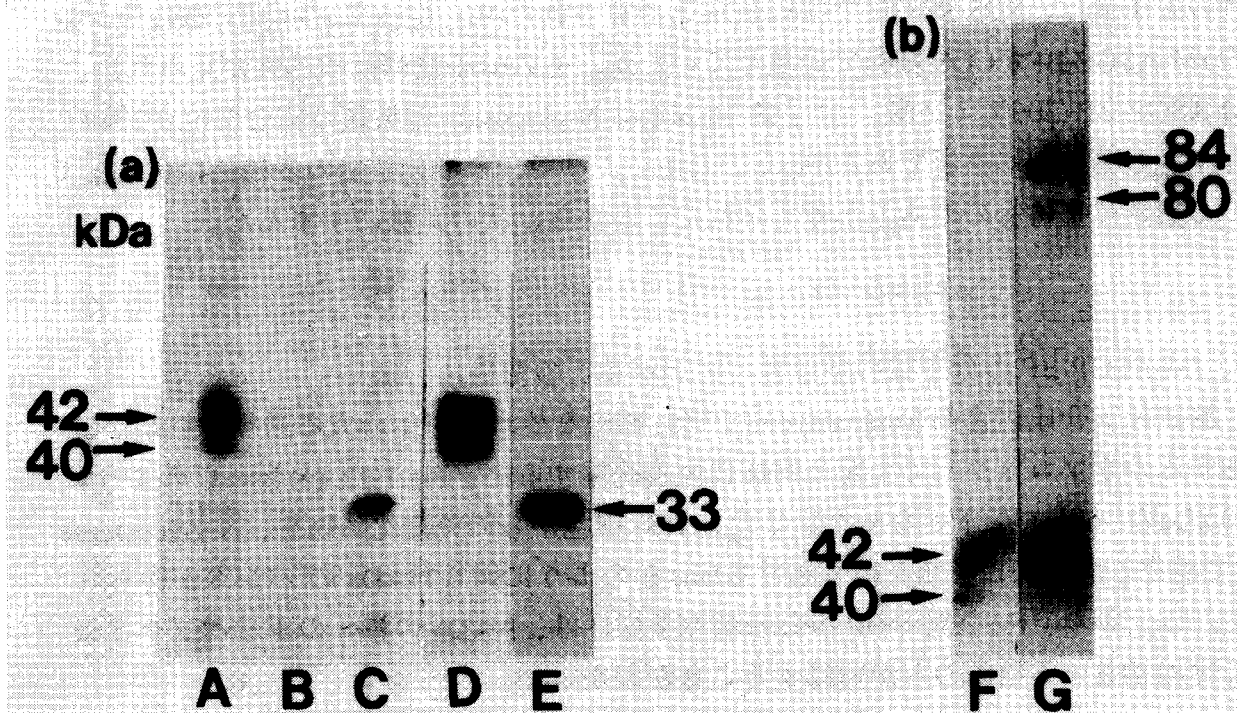
## 2、rM-ASGP-BP の分子量の多様性と付加糖鎖との関係

糖鎖付加合成阻害剤 Tunicamycin でT(S) 細胞を処理し、生合成の過程で糖鎖が付加するのをブロックして上記と同様に免疫沈降すると、Fig.1-12, (a) lane C のように 33 kDaの1本のバンドとなった。また、T(S) 細胞からの免疫沈降物を、N-glycosidase Fで消化し酵素的に糖鎖をはずしてもlane E のように同じ33 kDa の バンドが得られた。以上より、rM-ASGP-BP の分子量の多様性は、33kDa の単一のポリペプチド鎖に付加している糖鎖のちがいによることがわかった。

## 3、rM-ASGP-BP のaffinity 精製

上記の免疫沈降物である42 と 40kDaの糖タンパク質が、実際機能しているASGP-R のコンポーネントであるかどうかを調べるために、ASORの affinity column を用いてT(S) 細胞の抽出物からrM-ASGP-BP を精製した。還元条件下SDS-PAGE では、Fig.1-12, (b) lane F のように42 と 40 kDa に相当する2本のバンドが得られ、共にrM-ASGP-BP のコンポーネントであることがわかった。つまり、同一の遺伝子産物で付加糖鎖のみが異なっているが、糖鎖の違いはASGP-R としての機能に影響与えないようであった。このことは、肝ASGP-R についても報告されている(28)。

一方、非還元条件下SDS-PAGE では、lane G に見られるようにmonomer (42 と 40 kDa) の他に、84 と80kDa のバンドが検出され、これらはそれぞれ42 と 40kDa の homodimer であると考えられた。つまり、M-ASGP-BP の中にはdisulfide 結合により homodimer を形成するものもあるということを示している。



**Fig.1-12 Immunoprecipitation and affinity purification of the recombinant M-ASGP-BP.** Transfected COS-1 cells labeled with [ $^{35}$ S]Met and [ $^{35}$ S]Cys for 2.5h were extracted with Triton X-100. (a), cell extracts were treated with anti-RHL-1 antiserum. The immunoprecipitates were analyzed by Western blotting as described under "Experimental Procedures" (SDS-PAGE on 12.5% gels under reducing conditions). Lanes A and D show T(S) cells. Lane B shows T(A) cells, negative control. Lane C shows T(S) cells which had been incubated in the presence of tunicamycin. Lane E shows an N-glycosidase F digest of the immunoprecipitate shown in lane D. (b), recombinant M-ASGP-BP was purified from the extract by two cycles of affinity chromatography on a column of Sepharose 4B-ASOR. Fractions containing radioactivity were separated by SDS-PAGE on 7.5% gels under reducing (lane F) and nonreducing (lane G) conditions, and then the protein bands were detected by fluorography.



#### 4、rM-ASGP-BP のゲルろ過

肝レクチンRHL は、RHL-1 とRHL-2/3 からなる ヘテロオリゴマーとして機能する。一方、M-ASGP-BP のオリゴマー構造について詳細に調べるために、発現させたレクチンの分子量の決定を試みた。

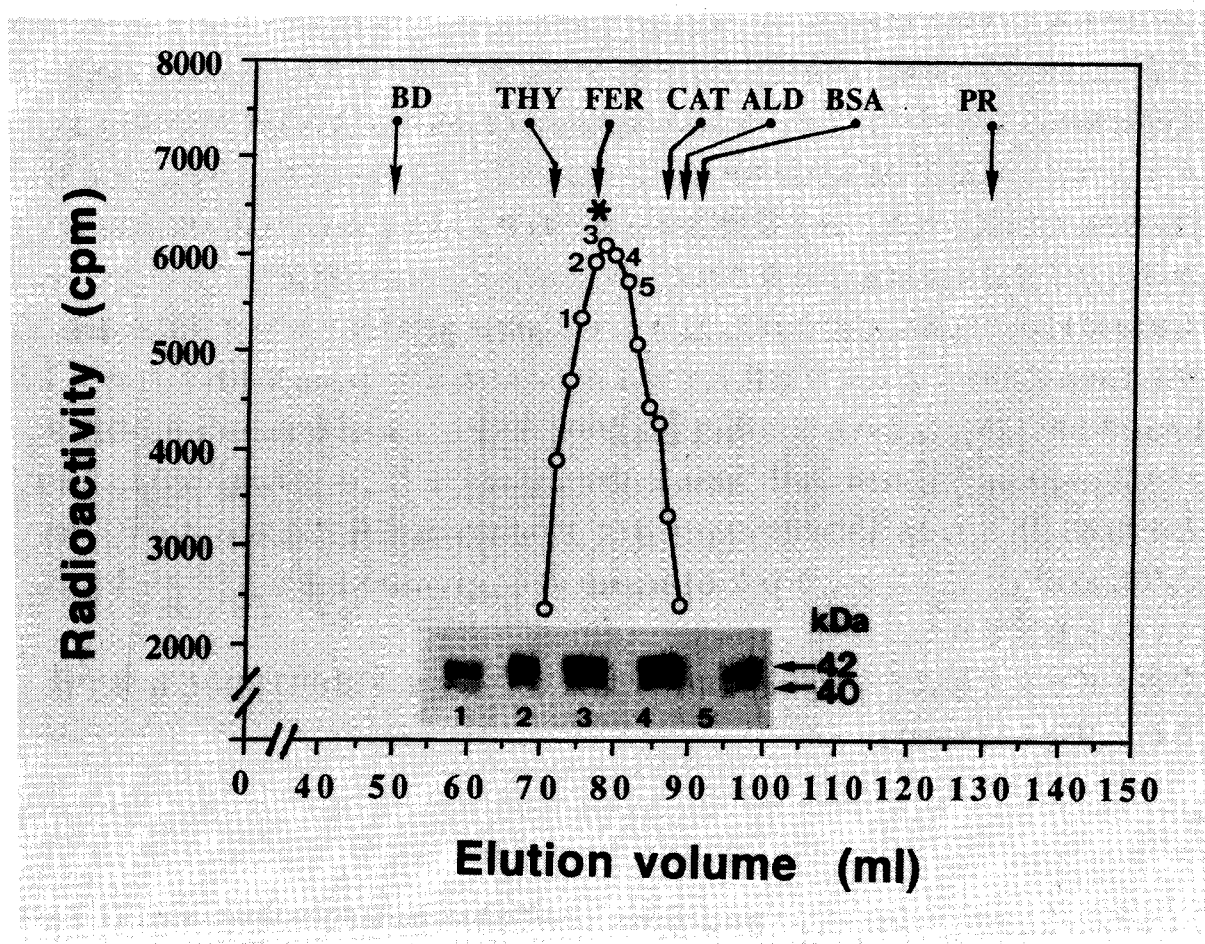
つまり、affinity column で精製した、 $[^{35}\text{S}]$ -アミノ酸でラベルされた rM-ASGP-BP を Triton X-100 を含むバッファーを用い Sepharose CL-6B でゲルろ過した。Fig.1-13 に示すように、可溶化 rM-ASGP-BP はシングルのピークとなって溶出され、全放射活性の92% が回収された。分子量標準マーカのタンパク質から、rM-ASGP-BP の見かけの分子量は 410 kDa と計算された（マクロファージから精製したものについても約 440 kDa の位置に溶出された(22)）。rM-ASGP-BP は膜タンパク質であることから Triton X-100 によって可溶化しているが、どの程度の Triton X-100 が可溶化 rM-ASGP-BP に結合しているかは明確ではない。ただし、Semliki Forest virus の膜タンパク質1mg には 0.21-0.54 mg の Triton X-100 が結合することが知られ (29)、このことを参考にすると rM-ASGP-BP の分子量は 270-340 kDa 程度になる。従って、40 および42 kDa のサブユニットからなる hexamer から octamer のホモオリゴマーを形成していると推定された。

なお、ピークを形成する各画分で40 と42kDa ポリペプチド鎖がほぼ同じ比率で検出された (Fig.1-13 inset)。

#### Fig.1-13 Gel filtration of the rM-ASGP-BP.

$^{35}\text{S}$ -labeled recombinant M-ASGP-BP was purified by affinity chromatography as described under "Experimental Procedures." The isolated protein was analyzed by gel filtration on a column of Sepharose CL-6B (1.2x108 cm) in the presence of 0.1% Triton X-100 as described under "Experimental Procedures." The eluate was monitored for radioactivity (○) and several fractions (1-5) were analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions followed by fluorography, the results being shown in the inset. The asterisk indicates the elution position of M-ASGP-BP isolated from peritoneal macrophages. Calibration standard : BD, blue dextran 2000 (void volume) ; PR, phenol red (total included volume); THY, thyroglobulin (Mr 669, 000); FER, ferritin (440, 000); CAT, catalase (232, 000); ALD, aldolase (158, 000); BSA, bovine serum albumin (67, 000).

Fig.1-13



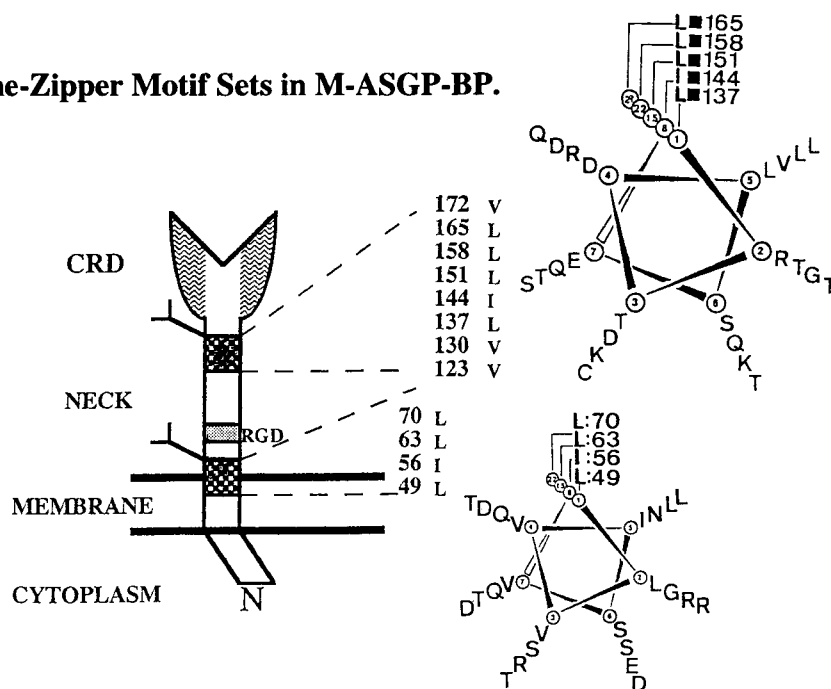
## 考察と総括

第1章では、著者らの研究室でタンパク質の精製、cDNAのクローニングに成功したラット腹腔マクロファージレクチン M-ASGP-BP について、単離したcDNAのコードするタンパク質を機能的に確認すると共にM-ASGP-BPのエンドサイトーシス型レセプターとしての働きを明らかにする目的でCOS-1細胞におけるcDNA発現系を確立した。その発現系によって、著者は本cDNAのみをCOS-1細胞にトランスフェクションするだけで、アシアロ糖タンパク質レセプター (ASGP-R) としての機能発現に十分であることを証明した。

発現させた組み換えM-ASGP-BP (rM-ASGP-BP) に関して、そのASOR に対する結合親和性、糖結合特異性、抗 RHL 抗血清に対する免疫化学的反応性、糖タンパク質・ポリペプチド鎖・オリゴマー構造としての分子量などがほぼマクロファージのものと一致していた。従って、単離したcDNA は真にM-ASGP-BP をコードしていることが証明された。以前、マクロファージから精製したレクチンは、Fig.1-1, lane A に示したようにSDS-PAGE では42 kDa の主要なコンポーネントとして検出されたが、60 と65 kDa の少数成分らしいものもわずかに見られた。そこで、これらの少数成分がASGP-R としての機能発現に必要なかもしれないという可能性がうまれた(9)。しかしながら、著者の示した結果は、明らかに42 kDa コンポーネント単独で ASGP-R として機能できるというものであった。少数成分のように見えたバンドは、contaminant か staining artifact だったかもしれない。

また、rM-ASGP-BP は Fig.1-13 で示したように、Triton X-100 を含む溶液中でオリゴマー構造 (6~8量体) として存在していた。このオリゴマー形成には、一つには disulfide linkage (Fig.1-12, (b) lane G) の関与が考えられる。また、さらにFig.1-14 に示すように、M-ASGP-BP には2カ所のロイシン(Leu) ジッパー様構造 (30) (7アミノ酸ごとに1ロイシン (Leu) があらわれるモチーフが4~5 回出現する) が存在した。つまり、M-ASGP-BP の膜貫通領域 (Leu-49, Ile-56, Leu-63, Leu-70) と糖認識ドメイン (carbohydrate recognition domain, CRD) に続く neck 部分 (Leu-137, Ile-144, Leu-151, Leu-158, Leu-165) にあり、これらもオリゴマー形成に関与していると考えられる(10)。

**Fig.1-14 2 Leucine-Zipper Motif Sets in M-ASGP-BP.**



即ち、この領域をFig.1-15のように書き直すと、  
両親媒性の  $\alpha$ -helical coiled-coil 構造をとると  
思われることから、このヘリックス構造がオリ  
ゴマー形成をつかさどっているともいえる。

他にRHL、Kupffer cell receptor などにもこの  
構造は見られ、C-type レクチンスーパーファ  
ミリーの膜結合型タンパク質に存在する類似  
したモチーフである (31)。

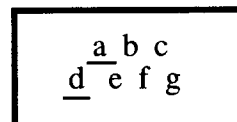
哺乳類の肝臓のASGP-R は2~3種の類似し  
たサブユニットから構成されている。

ラビットでは40 と48 kDa の2種類のポリペ  
プチド鎖からなる(32)。ラット (RHL)では42  
(RHL-1)、49 (RHL-2)、54 kDa (RHL-3)の3サ  
ブユニットからなり(33)、マウスでも類似し  
たものが報告されている(34)。一方、ヒト  
(HHL)では46 (HHL-1)と 49-50 kDa (HHL-2)  
の2種類からなる(35)。

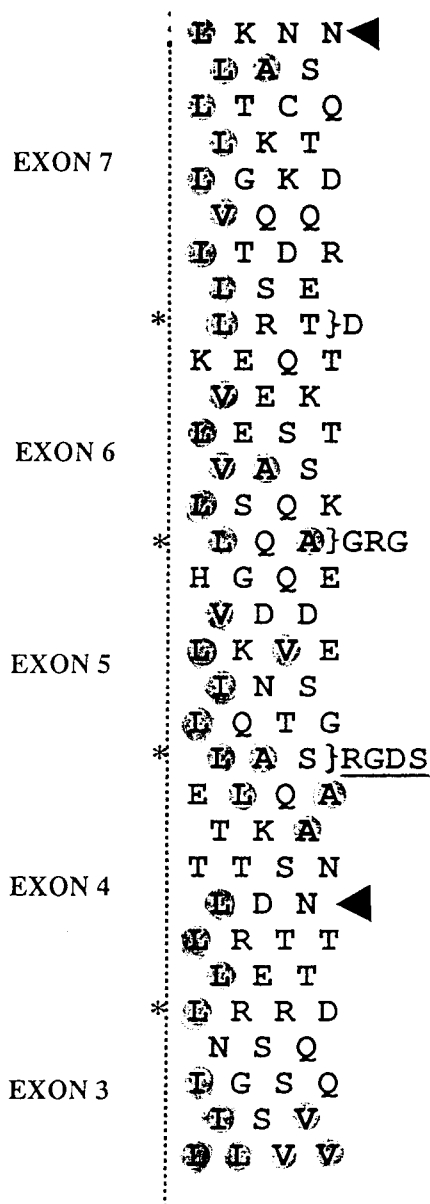
さて、これらのサブユニットが別々に独立し  
てホモで機能するものなのか、すべてが  
ASGP-R の形成に必要なのかについて様々な  
議論があった。

RHL については、架橋実験によって  
RHL-1、RHL-2のそれぞれホモオリゴマー  
が検出されたという報告があるが(36)、他  
方RHL-1、RHL-2/3 に対するいずれの抗血  
清で免疫沈降してもRHL の3成分すべてが  
検出されたともいわれる(37)。しかし、3成  
分を機能的に調べた報告として、McPhaul  
とBerg (12)がASORの結合と細胞内取り込  
みが可能なレセプター発現には、RHL-1 と  
RHL-2/3 の両方のcDNA の細胞へのラン  
スフェクションが必要であることを示した。

**Fig.1-15**  
**alpha-helical coiled-coil structure**  
**of M-ASGP-BP.**



The seven-amino acid heptad repeat (a-g) in  
which the a and d positions frequently have  
aliphatic side chains (leucine, isoleucine,  
valine) folds into two turns of right-handed  
alpha-helix.



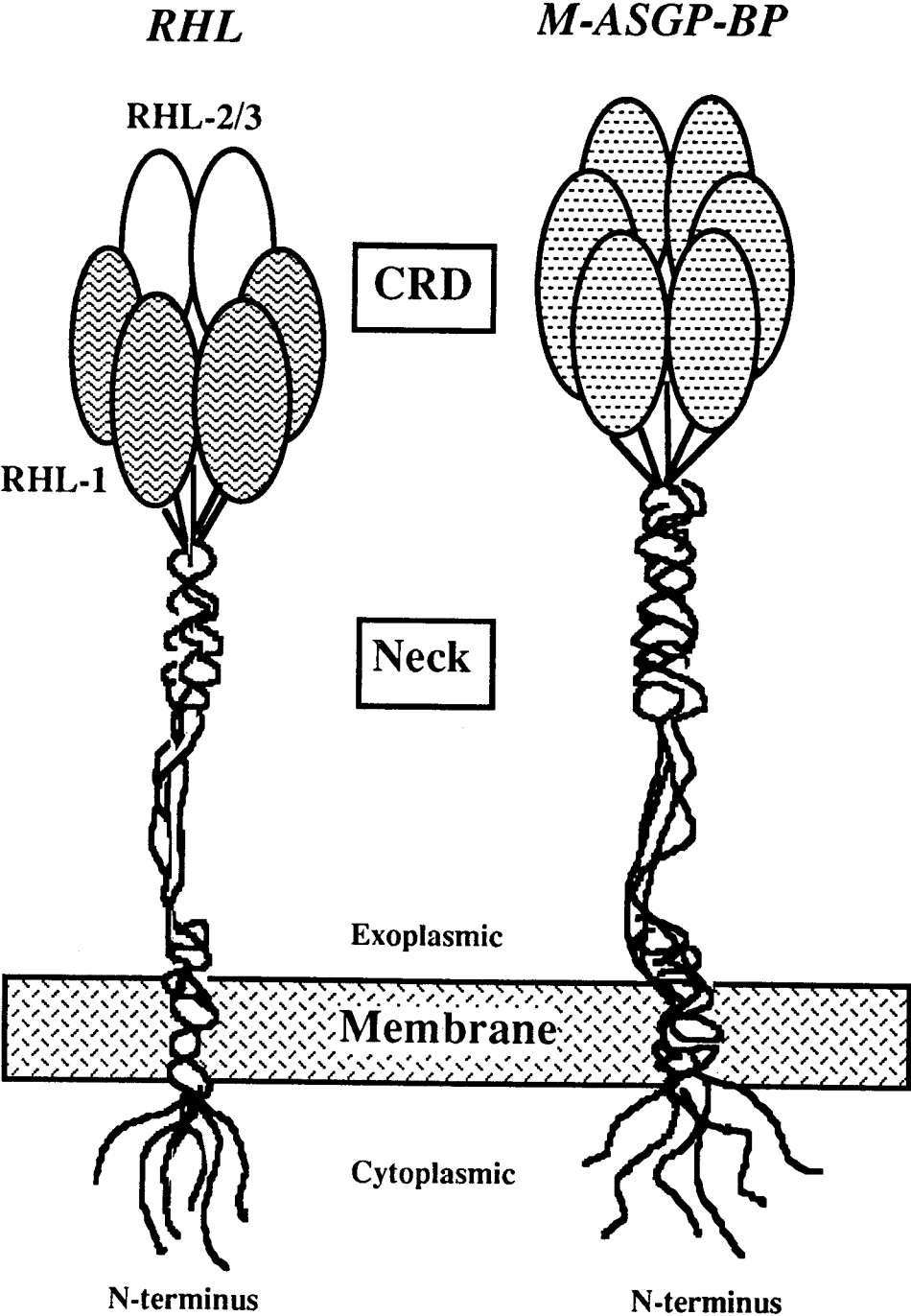
HHLの場合も、HHL-2が存在しなくとも HHL-1は細胞表面に輸送されるが、単独でASORを結合させることはできなかったとされる(13)。逆に、HHL-2だけを発現させても、急速に小胞体で分解され細胞表面に到達しないといわれている。以上より、機能的なASGP-Rを発現するためには、2種のポリペプチド鎖が必要であるという結論が得られた。

肝臓 ASGP-R に高い親和性を示す糖鎖は、ある特定の3本鎖(triantennary) 構造であるといわれている(38)。そのtriantennary 糖鎖の3個のGal 残基のそれぞれを別個に photoaffinity 標識試薬で修飾した誘導体を作製し、これをプローブとしてRHL との反応性を調べたRice らの報告がある(39)。それによれば、特定の1つのGal が RHL-2/3 に結合し残りの2つのGal がRHL-1 に特異的に結合していた。このことは、3個のGal 残基は決してランダムにASGP-R のサブユニットに結合するのではなく、2種のサブユニットにより構築された糖認識ドメイン(CRD) に特定の空間配置を保ちながら結合するということを示している。ところで、RHL-1単独では ASOR とは結合できないが、高親和性の合成糖リガンド(Gal<sub>100</sub>-poly -Lys) とは結合したという Braiterman らの報告がある(40)。これは、Gal<sub>100</sub>-poly -Lysでは非常に高密度にGal が含まれるために、このうちのいくつかが偶然 CRD にフィットしたためと考えられる。

RHL は4個のRHL-1 と2個の RHL-2/3 からなる6 量体のヘテロオリゴマーとして ASGP-R として機能すると考えられている。RHL-1と M-ASGP-BP は高い相同性を示し、特にCRD のホモロジーは75% に達する。しかし、大きな相違点としてM-ASGP-BP は単一のサブユニットからなる6~8 量体からなるホモオリゴマーとして機能することを著者は証明した (Fig.1-16)。さらに、サブユニット構成の違いに加え、M-ASGP-BPには RHL-1には存在しない24アミノ酸からなる挿入配列が neck 部分に存在し CRDをよりフレキシブルにしている可能性がある。実際、M-ASGP-BP の糖特異性は未だ詳細に調べられてはいないが(第3章で論ずる)、肝臓ASGP-R とは少し異なり、3本鎖構造より4本鎖糖鎖にさらに一層高い親和性をもつという報告もある(41,42)。

さて、以上のように第1章では著者はCOS 細胞におけるcDNA発現系を用い、レクチンシグナルをマクロファージ表面の100倍以上に増幅することによりM-ASGP-BP の構造とASGP-Rとしての機能との関係を明らかにした。M-ASGP-BP は肝臓の ASGP-R と類似しながらも、シンプルな構造をもっているため糖特異的なエンドサイトーシスレセプターの実験モデルとしても有用である。以下の章では、この発現システムを用いM-ASGP-BP のASGP-R としての機能についての研究をさらにすすめている。

**Fig.1-16 Schematic comparison of M-ASGP-BP and RHL.**



## 実験方法（第1章）

### 1、試薬

制限酵素、T4 DNA ligaseなどの DNA操作のための試薬はタカラ酒造（京都）から購入した。mannan はパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をオリエンタル酵母社より購入し、Lee らの方法 (43)に従って調製し、さらにSephadex G-100 よるゲルろ過および DEAE-cellulose によるイオン交換クロマトグラフィーで精製した。オロソムコイド(OR)はアメリカ赤十字社の M.Wickerhauser 博士より恵与された。ASOR はORを0.05M 硫酸中で80°C, 1時間処理することにより、糖鎖の非還元末端から化学的にシアル酸をはずすことにより調製した。Neoglycoprotein である Man-BSA、GlcNAc-BSA、L-Fuc-BSA、Gal-BSAはそれぞれ 1mol BSA あたり33、43、28、および31mol の糖を含んでおり、これらは アメリカ Johns Hopkins 大学 Y.C.Lee 教授より恵与された。Sodium [<sup>125</sup>I]iodide (carrier-free) はAmersham Corp. から、そして [<sup>35</sup>S]Protein Labeling Mix は DuPont-New England Nuclear Research Products から購入した。Fluorescein-conjugated anti-rabbit IgG goat IgG fraction は Organon Teknika Corp.より、normal rabbit serum はDAKO-immunoglobulin a/s (Denmark)より、Pansorbin cells (*Staphylococcus aureus* cells)は Calbiochem Corp.よりそれぞれ購入した。Tunicamycin はSigma 社から、N-glycosidase F は Boehringer Mannheim 社から購入した。Sephacrose CL-6Bと gel filtration calibration kit はPharmacia LKB Biotechnology Inc.から購入した。

### 2、発現ベクター pdKCR-M-ASGP-BP の構築

M-ASGP-BP の全coding 領域は、cDNA cloneをふくむM13mp18、MC9 (10) より切り出し、pdKCR (Osaka Bioscience Institute(Osaka) の長田重一博士より恵与された) のBamHI site にligation させた (18, 19)。発現ベクターで、cDNAがpdKCR のSV 40 promoter 下流に正方向に組み込まれたものを sense vector、また、逆方向のものを antisense vectorと呼ぶことにした。

### 3、細胞培養とDNA トランスフェクション

COS-1 細胞 (Japanese Cancer Research Resources Bank (Tokyo) から恵与)は、10% fetal calf serum (GIBCO) を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)（日水製薬）中、CO<sub>2</sub> incubator (37°C、5% CO<sub>2</sub>) にて培養した。

COS-1 細胞へのトランスフェクションには、Chen & Okayama らの方法 (20)により塩化セシウム密度勾配法にて2回精製した plasmid DNA (5 $\mu$ g)を、 $1-10 \times 10^5$  cells / 35mm wellに対してリン酸カルシウム共沈法により導入した (21)。また、radiolabeling のためには、15 $\mu$ gの plasmid DNA を $1 \times 10^6$  cells / 10cm dish にトランスフェクションした。トランスフェクション後、48-72 時間の細胞を以下の実験に用いている。

#### 4、免疫染色

トランスフェクション後60時間のCOS 細胞、およびラット腹腔マクロファージに対して、間接蛍光抗体法を行った (44)。3.7% formaldehyde にて固定した細胞を一次抗体に抗RHLラビット抗血清 (9)、二次抗体にfluoresceinisothiocyanate-conjugated ヤギ抗ラビットIgG 抗体を用いた。染色した細胞は、蛍光顕微鏡 (Nikon) にて観察し写真はKodak Ektachrome 400 film におさめた。

#### 5、 $^{125}$ I-ASOR の結合 (Binding)、取り込み(Uptake) および分解 (Degradation)

ASORおよび mannanはGreenwood らのchloramine-T 法によりヨードラベルした (45)。トランスフェクション後 60時間の細胞 ( $1-10 \times 10^5$ /35mm well)に対して(46, 47)に述べられている方法でASOR のbinding, uptake 実験を行った。4°C、10分間 preincubation した後、細胞を2  $\mu$ g/ml の $^{125}$ I-ASOR (1ml/well) と4°C、1時間 incubation した。medium を取り除いた後、PBS 1ml で3 回洗浄し各well に1ml の0.1M-NaOH を加え、細胞を溶解し結合放射活性をBeckman  $\gamma$ -5000 counter にて測定した。また、取り込み活性は2  $\mu$ g の $^{125}$ I-ASORを含むDMEM (prewarmed at 37°C) 1ml をトランスフェクション後 60時間の細胞に加え37°C、20 分間 incubation した。medium を取り除いた後、PBS または5 mM EDTA を含むPBS で氷上3回洗浄後、各well に1ml の0.1M-NaOH を加え上記のように放射活性を測定した (46)。また、ブランク (非特異的結合と取り込み) は100 モル過剰のラベルしていないASORまたは 5 mM EDTA存在下決定した。特異的結合と取り込みは、それぞれのサンプルについてのブランクの値を引いたものを計算した。阻害実験は図に示したような各濃度の様々な単糖、糖タンパク質存在下行った。取り込みのコントロールは同じ条件下、阻害物なしで測定した。分解の速さは、時間経過に伴いmedium 中に蓄積する酸可溶性放射活性の増加として測定した。すなわち、細胞表面レセプターに $^{125}$ I-ASOR をあらかじめ結合飽和させた(4°C、1時間) 後、37°C に加温したmedium を加えてあらためてCO<sub>2</sub> incubator で培養する。各時間ごとにmedium をサンプリングし、等量の氷冷した4% リンタンゲステン酸・20% トリクロロ酢酸を加える。



水中10分静置後、4,000 rpm、10分間遠心し沈殿を取り除き上清の放射活性を測定した(24)。この条件で、intactな<sup>125</sup>I- ASORは99%沈殿し、iodotyrosineは溶液中に残ったままとなる。

#### 6、トランスフェクションしたCOS細胞のRadiolabelingと組み換えM-ASGP-BP (rM-ASGP-BP)の免疫沈降

トランスフェクション後60時間の細胞をMet、Cys、血清を含まないDMEM中で20分間培養した後、<sup>[35S]</sup>-Metと<sup>[35S]</sup>-Cysそれぞれ200 μCi分を1x10<sup>6</sup> cells / 10cm dishに対して加えて2.5時間 incubationした。放射ラベルされた細胞は、1% Triton X-100, 0.5 mM EDTA, 0.4 M KCl, 1 μg/ml aprotinin, 100 μg/ml phenylmethanesulfonyl fluorideを含む0.01M imidazole/HCl buffer, pH 7.8 (lysis buffer)で可溶化した。さらに、核画分を低速遠心によって取り除き、上清を4°Cで1時間 normal rabbit serum (5 μl)とともに preincubationし50 μlのPansorbin cellを加えた。続けて1時間 incubationした後、遠心によって沈殿を取り除き、上清に抗RHL-1抗血清(Columbia大学・Drickamer博士より恵与)を加えて4°C、2時間 incubationした。そして、再びPansorbin cellを加え incubationを更に1時間続けて得た最終免疫沈降物を、次の洗浄バッファーにて3回洗浄した。1回目は0.1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.25% gelatinを含む50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 (NET-buffer)で、次に0.1% SDSを含むNET-bufferそして最後は0.1% Nonidet P-40を含む10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5によって行った。サンプルは、SDS-PAGE サンプルバッファー中 boilingして溶出させた。新しく生合成されるM-ASGP-BPに対するtunicamycinの影響を調べるためにはトランスフェクションしたCOS細胞を3 μg/mlのtunicamycinで6時間 preincubationしてから<sup>[35S]</sup>アミノ酸にて放射ラベルした。その免疫沈降も上記のように行った。N-glycosidase F消化のためには、まずM-ASGP-BPをPansorbin沈殿から0.1% β-mercaptoethanolを含む0.5% SDS中で3分間 boilingして溶出させた。そして、サンプルを0.17% SDS、1% β-mercaptoethanol、0.025 M EDTA、1% Triton X-100を含む0.19 M sodium phosphate buffer, pH 8.0中で0.6 unitsのN-glycosidase Fを加え37°Cで20時間消化した(10)。サンプルはSDS-PAGE (48) (12.5% gel)にて還元条件で分離した。gelは乾燥させて、Fluorographyにてタンパク質のバンドは検出した。

#### 7、rM-ASGP-BP のaffinity 精製

トランスフェクションしたCOS細胞 ( $10 \times 10^6$  cells)を [ $^{35}\text{S}$ ] アミノ酸で上記のようにラベルし、2 % Triton X-100, 100  $\mu\text{g/ml}$  phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5 mM EDTA, 0.4 M KCl を含む 0.01M imidazole-HCl buffer, pH 7.8 にて可溶化した。細胞可溶化物を  $4^\circ\text{C}$ , 30 分間かくはんし、遠心によって可溶化タンパク質を回収した。細胞抽出物に終濃度0.02Mとなるよう  $\text{CaCl}_2$ を加え、4 ml のSephrose 4B-ASOR とともに30分 incubation した (7)。0.5 % Triton X-100, 1.25 M NaCl, 0.02 M  $\text{CaCl}_2$  を含む0.02 M imidazole-HCl buffer, pH 7.8にて洗浄した後、2 mM EDTA, 0.5 % Triton X-100, 1.25 M NaCl, 0.02 M  $\text{CaCl}_2$ を含む0.02 M imidazole-HCl buffer, pH 7.8で rM-ASGP-BP を溶出させた。再び、溶出物に  $\text{CaCl}_2$ を0.02 Mとなるように加え、Sephrose 4B-ASOR (2ml) affinity column にapplyし、2回目は 0.02 M galactose によって溶出させた(9)。そして、放射活性を含む画分を回収した。脱塩の後、還元 (0.2 M dithiothreitol)および非還元条件でSDS-PAGE (7.5 % gel )にて分離した。その後、Fluorography にてタンパク質のバンドは検出した。

#### 8、rM-ASGP-BP のゲルクロマトグラフィー

[ $^{35}\text{S}$ ] アミノ酸でラベルしたトランスフォーマントから、2 回のSephrose 4B-ASOR affinity column によって精製した rM-ASGP-BP を Sepharose CL-6B (1.2x108 cm) でゲルろ過した。溶出バッファーには 1.25 M NaCl, 2 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100 を含む0.02 M imidazole-HCl buffer, pH 7.8を用い、1.5 ml 画分ごと分取した。放射活性でモニターし (Beckman, LS 7500)、還元条件でSDS-PAGE した。gel filtration calibration kit (Pharmacia) を分子量スタンダードとして利用した。

## 第2章

ラット腹腔マクロファージのガラクトース/N-アセチルガラクトサミン特異的レクチン(M-ASGP-BP)のエンドサイトーシスにおける細胞内移行シグナルの解析

第1章では末端にGal/GalNAcをもつ糖タンパク質特異的エンドサイトーシスレセプターであるM-ASGP-BPが、42kDaの単一のポリペプチド鎖からなるホモオリゴマー(hexamer or octamer)として機能できることを示した(11)。

様々なエンドサイトーシス型レセプターが細胞内に移行する際に必要なシグナルとして、細胞質領域のチロシン(Tyr)残基を含む4~6アミノ酸(特にTyr-X-Y-Phe、X,Yは保存されていない)が重要であるされている(49)。

そのcDNA配列よりM-ASGP-BPのN末端細胞質領域にも類似のアミノ酸配列、Tyr5-Glu6-Asn7-Phe8が存在し、Tyr-5は細胞質領域で唯一のチロシン残基であった。そこで、まずCOS細胞で発現させた組み換えM-ASGP-BPのシーケンス分析を行い、N末端からThr2-Met3-Ala4-Tyr5-Glu6-Asn7-Phe8であることを明らかにした。同時にこのTyr-5がリン酸化を受けることを見出した。この細胞質領域が実際レセプターの細胞内移行シグナルとして機能するかどうかを調べるため、このTyr-5に対しoligonucleotide-directed mutagenesisにより変異体を作製し野生体とともにCOS細胞に発現させエンドサイトーシス活性を定量した。すると、Tyr-5欠失体やアラニン(Ala)置換体ではアシアロオロソムコイド(ASOR)の細胞内移行量が野生体の約1/4に低下した。一方、フェニルアラニン(Phe)置換体ではほぼ野生体と同様の速さでASORが細胞内へ移行した。従って、Tyr-5はリガンドの迅速な細胞内移行に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、トランスフェクションする野生体およびTyr-5欠失体のcDNAの比率を変化させたco-transfection実験によると、その急速な細胞内移行のためには、そのオリゴマー構造を構成するサブユニットの半分以上が野生体でなければならないと考えられた(15)。

### 第1節 組み換えM-ASGP-BP (rM-ASGP-BP) のN末分析とN末細胞質領域チロシン(Tyr-5)のリン酸化

#### 1、組み換えM-ASGP-BP (rM-ASGP-BP) のN末分析

以前著者らの研究室において、チオグリコール酸培地刺激後のラット腹腔浸出性マクロファージから単離精製したM-ASGP-BPのN末端分析を行ったところ、

Tyr-5を含むN末端 8 アミノ酸がプロセッシングをうけて除去されるという結果を得ていた (10)。つまり、Met1-Thr2-Met3-Ala4-Tyr5-Glu6-Asn7-Phe8 が除去されて、Gln-9 がN 末端アミノ酸であった (Fig.1-2, 1-3)。この結果は、ひとつにはレセプター精製の過程で起こったartifact、つまり、Phe-8 のC 末端においてchymotrypsin 様プロテアーゼによって加水分解されてしまった可能性が考えられた。あるいは、Tyr -5 は細胞内移行シグナルとして機能しておらずプロセッシングをうけて除去され、別にシグナルが存在する可能性もあった。そこで、chymotrypsin に対するプロテアーゼ阻害剤であるaprotinin、chymostatin、TPCKおよび PMSF 存在下、M-ASGP-BP cDNA をトランスフェクションしたCOS 細胞より rM-ASGP-BPを 精製した。この rM-ASGP-BP のシーケンスを調べてみると、N 末端より Thr2-Met3-Ala4-Tyr5-Glu6-Asn7-Phe8であった (Fig.2-1)。

**Fig.2-1 Determination of the amino-terminal sequence of the recombinant M-ASGP-BP.**

Cycle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Residue	T	M	A	Y	E	N	F	Q	N	L
Yield(pmol)	26	16	28	20	17	20	20	13	16	28

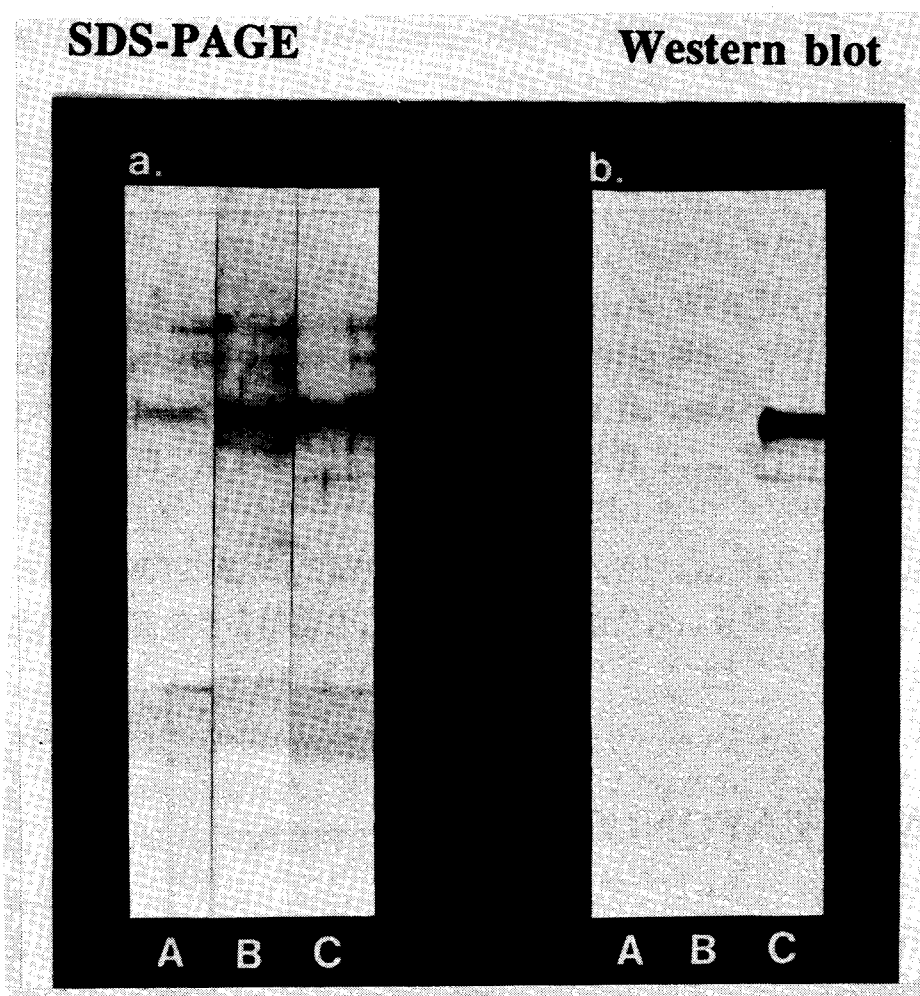
つまり、M-ASGP-BP 生合成の過程でN 末端のメチオニン (Met-1)のみが取り除かれることがわかった。

## 2、N 末細胞質領域チロシン (Tyr-5) のリン酸化

酵素活性の制御や情報伝達のモジュレーションにおけるチロシンのリン酸化の役割はよく知られている。また、本章で述べる細胞内移行シグナルとしての細胞内チロシンの重要性を検討する上でもチロシンのリン酸化を調べた。

M-ASGP-BP cDNA をトランスフェクションしたCOS 細胞をホスファターゼ阻害剤である、sodium orthovanadate、phenylarsine oxide (PAO) 存在下または非存在下で 37°C、1時間培養しSephrose 4B-ASOR affinity column により rM-ASGP-BP を精製した。精製したrM-ASGP-BPをSDS-PAGE 後、PVDF membrane にトランスファーし、抗ホスホチロシン抗体 PY 20 によってチロシンのリン酸化を検出した。一方、対象としてTyr-5 欠失体 (第 2 節参照) についても同様のことを行った。

Fig.2-2, a はSDS-PAGE 後のゲルを銀染色したもので、ホスファターゼ阻害剤存在下培養したTyr-5 欠失体(A)、野生体(C)、ホスファターゼ阻害剤非存在下培養した野生体(B)についてはほぼ40-42kDa のところに精製したrM-ASGP-BP（欠失体および野生体）が検出された。一方、Fig.2-2, b では、抗ホスチロシン抗体PY 20によるWestern blot を表しており、ホスファターゼ阻害剤存在下培養したTyr-5 欠失体(A)および阻害剤非存在下培養した野生体(B)についてはリン酸化チロシンは検出されなかったが、ホスファターゼ阻害剤存在下培養した野生体(C)についてののみリン酸化チロシンが検出された。



**Fig.2-2 Recombinant M-ASGP-BP phosphorylation.**

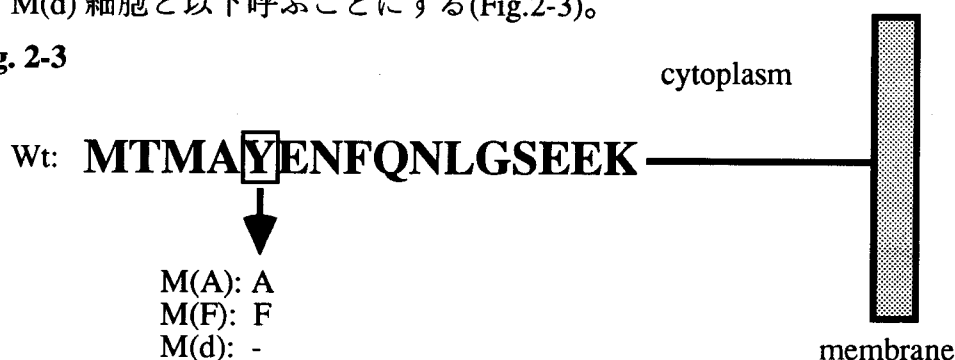
Transfected cells with wild type or Tyr-5 deleted mutant M-ASGP-BP cDNA were incubated for 60 min at 37 °C in the presence (lane A & C) or absence (lane B) of phosphatase inhibitors, sodium orthovanadate (200  $\mu$ M) and PAO (20 $\mu$ M). Tyr-5 deleted mutant (lane A) and wild type M-ASGP-BP (lane B&C) purified by Sepharose 4B -ASOR affinity column were analyzed by SDS-PAGE (a) and Western blotting with PY 20, anti-phosphotyrosine antibody (b).

Tyr-5 がM-ASGP-BP の細胞質領域の唯一のチロシンであり、またTyr-5 欠失体については検出されないことからTyr-5 がリン酸化を受けていることが明らかになった。また、ホスファターゼ阻害剤存在下でなければ検出されないことから、細胞内に存在する様々なホスホチロシンホスファターゼによってすみやかに脱リン酸化されてしまうと考えられる。ホスファターゼ阻害剤の作用メカニズムは複雑であるが、sodium orthovanadateはインスリンレセプターのチロシンキナーゼ活性を亢進するという報告もあり(50)、PAO とともにM-ASGP-BPのチロシンのリン酸化を促進するとも考えられる。いずれにしても、Tyr-5がチロシンキナーゼの基質となり、細胞内でリン酸化されることが示された。さて、さらにこのTyr-5がレセプターの細胞内移行シグナルとして機能しうるかどうかが調べた。

## 第2節 Tyr-5 に対する置換体、欠失体 cDNA の作製とCOS 細胞へのトランスフェクション

M-ASGP-BP cDNA クローン MC9 (10) に対してoligonucleotide- directed mutagenesis法を用い、Tyr-5 をアラニン(Ala)、フェニルアラニン(Phe)に置換、あるいは欠失(deletion)させたcDNA を作製した。発現ベクターの構築は、第1章で既に述べた様にpdKCR に組み込み行った。COS-1 細胞へのトランスフェクションも同様にリン酸カルシウム共沈法により行った(11)。野生型 M-ASGP-BP 発現細胞(Wt 細胞)に対して、Ala または Phe 置換体、欠失体 cDNA を導入した細胞をそれぞれM(A)、M(F)、M(d) 細胞と以下呼ぶことにする(Fig.2-3)。

**Fig. 2-3**



### 第3節 Tyr-5 置換体、欠失体のアシアロ糖タンパク質レセプターとしてのエンドサイトーシス活性

#### 1、リガンド( $^{125}\text{I}$ -ASOR)の Wt、M(A)、M(F)、M(d)細胞への結合 (Binding)、細胞内移行 (Internalization)

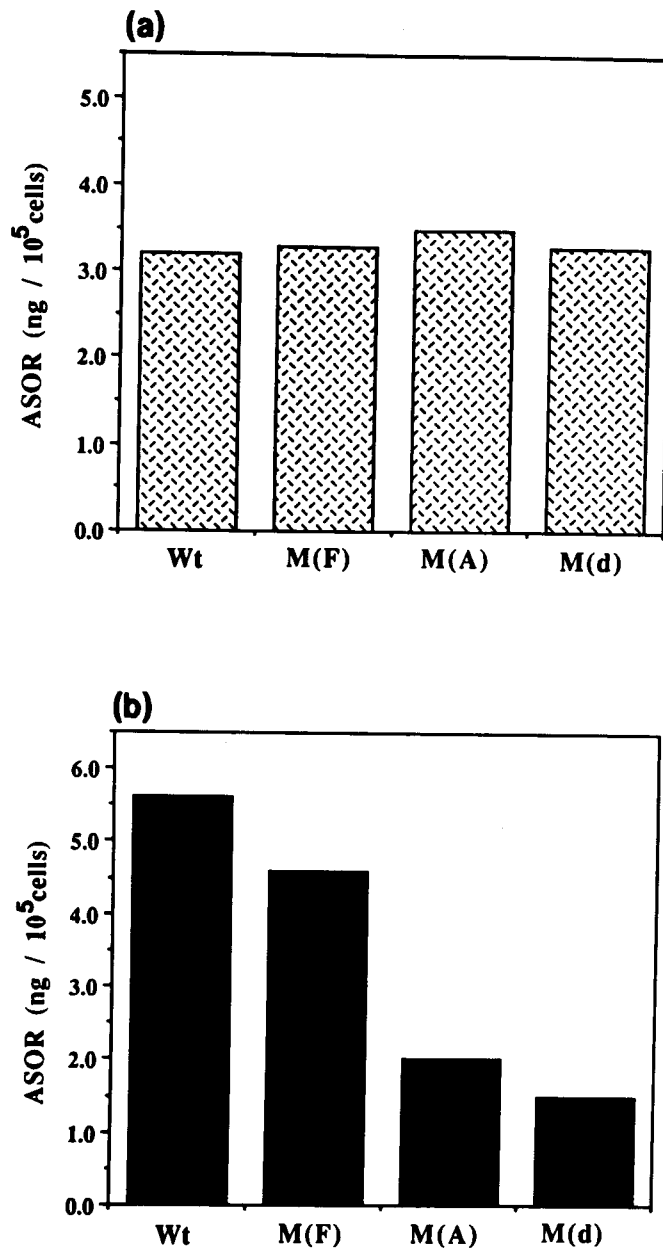
野生型、変異型 M-ASGP-BP cDNA を発現させた各種トランスフォーマントについて、 $^{125}\text{I}$ -ASOR をリガンドとしてその細胞表面結合量と細胞内移行量を検討した。

Fig.2-4 (a) に見られるように、 $^{125}\text{I}$ -ASOR と  $4^{\circ}\text{C}$ 、1時間 incubation すると Wt、M(A)、M(F)、M(d)細胞それぞれ同程度の細胞表面結合量を示した ( $\sim 3 \text{ ng}/10^5 \text{ cells}$ )。これは、各種トランスフォーマントの細胞表面の結合部位がほぼ同数であり、その結合部位数に対しては変異による影響がないことを意味している。

一方、 $37^{\circ}\text{C}$ 、20分間 incubation したときのリガンドの internalization は各種トランスフォーマントで異なっていた (Fig.2-4 (b))。M(d) および M(A) 細胞の ASOR 取り込み量 (それぞれ  $1.4$  と  $1.8 \text{ ng of ASOR} / 10^5 \text{ cells}$ ) は Wt 細胞 ( $5.6 \text{ ng of ASOR} / 10^5 \text{ cells}$ ) の約  $1/4$  まで低下していた。ところが、M(F) 細胞のエンドサイトーシス活性は Wt 細胞よりわずかに低下している程度であった ( $>80\%$  to Wt cells)。

#### 2、細胞表面結合リガンドの各種トランスフォーマント細胞内への Internalization

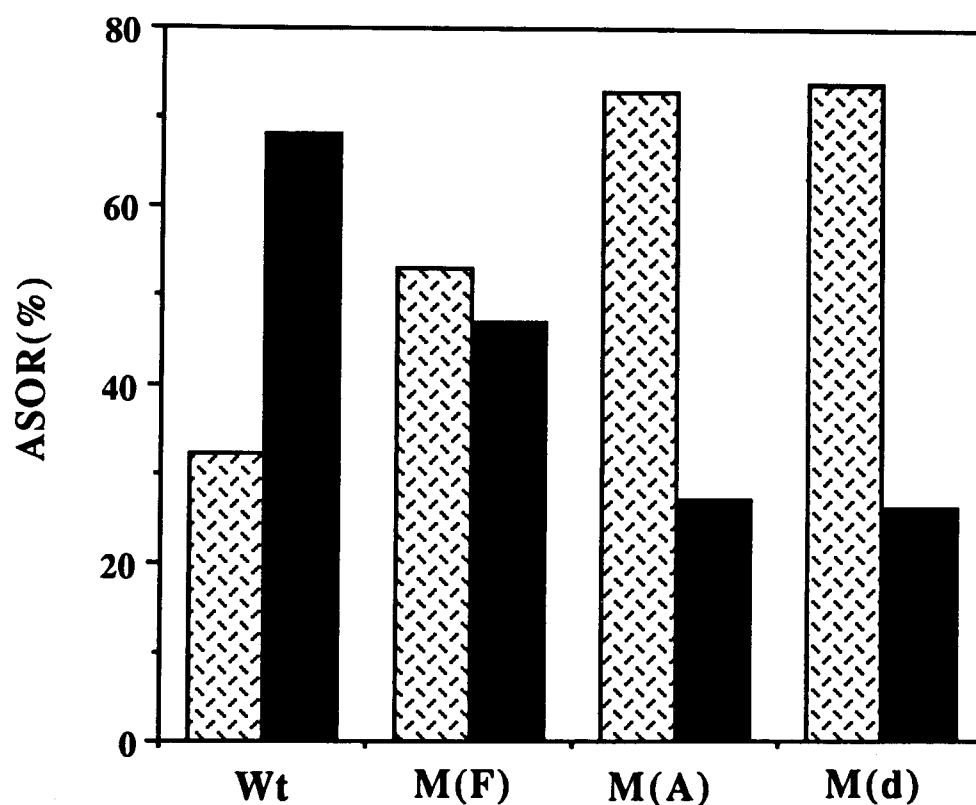
リガンドの取り込みがおこらない  $4^{\circ}\text{C}$ 、1時間の incubation で ASOR をあらかじめ細胞表面に結合させ、結合しなかったものは洗浄により取り除き、この表面結合量 (放射活性 = A) を  $100\%$  とした。その後、さらに  $37^{\circ}\text{C}$ 、20分間 incubation し、その A の細胞内へ Internalization される割合を調べた。各種トランスフォーマントにおける  $^{125}\text{I}$ -ASOR の細胞質と細胞表面への分布は Fig.2-5 に示している。Wt 細胞では20分間で A の  $68\%$  が細胞内に Internalization されていた。その割合は、M(F) 細胞では幾分低下していた。しかし、M(A)、M(d)細胞では A の  $25\%$  のみが Internalization されるにすぎず、 $70\%$  以上の放射活性は細胞表面に残存した。また、20分間の incubation では、リガンドの分解産物は medium 中への酸可溶性放射活性 (11) として検出されなかった。



**Fig.2-4 Specific surface-binding and internalization of <sup>125</sup>I-ASOR by transfectants.**

Trasfected COS-1 cells [ wild type (Wt) and mutant M(F) (Tyr → Phe), M(A) (Tyr → Ala), and M(d) (Tyr deleted) ] (1x10<sup>5</sup> cells) were incubated with 2 μg of <sup>125</sup>I-ASOR at 4 °C for 60 min (a) or 37°C for 20 min (b). The cells were washed with PBS (a) or 5 mM EDTA (b) as described under " Experimental Procedures." (a) shows the specific binding on the cell surface and (b) the amount of internalized ligand.





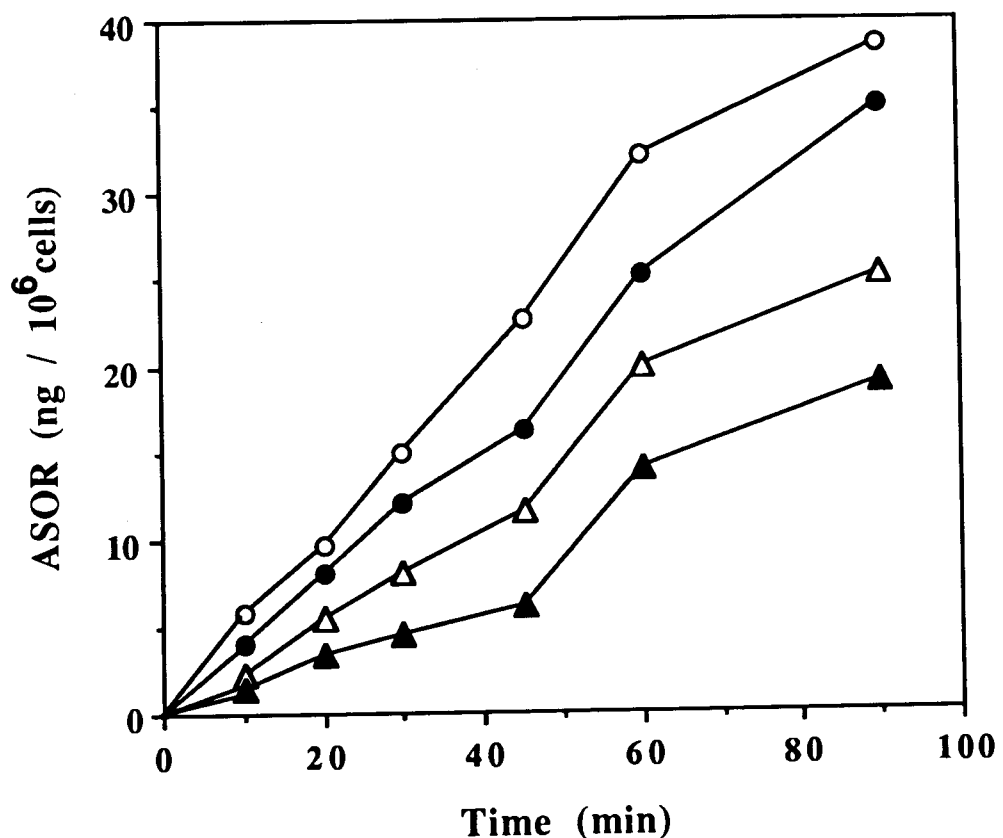
**Fig.2-5 The fate of prebound  $^{125}\text{I}$ -ASOR upon incubation at 37 °C.**

Transfected COS-1 cells [ Wt, M(F), M(A), and M(d) ] ( $1 \times 10^5$  cells) were incubated with  $^{125}\text{I}$ -ASOR at 4°C for 1h to saturate the surface receptor . After washing , the cells were warmed by the addition of serum-free medium at 37 °C, and then incubated for 20 min at 37 °C. The amounts of specific binding (■) and internalization (▨) were determined as described under "Experimental Procedures". The percentage distribution of  $^{125}\text{I}$ -ASOR between the cell surface and cytoplasm is shown. The amount of prebound  $^{125}\text{I}$ -ASOR was taken as 100 %.

### 3、各種トランスフォーマントへのリガンドの internalization 量の時間経過

Fig.2-6 にはリガンドの internalization 量の時間経過をグラフに表している。各種トランスフォーマント細胞を  $^{125}\text{I}$ -ASOR とともに  $37^\circ\text{C}$ 、グラフに示す時間だけ incubation した後、細胞表面結合リガンドを EDTA によって遊離させ、細胞内に internalization されたリガンド量を測定した。また、すべての細胞のリガンド結合部位数は同レベルであった。最初の60分間の Wt 細胞における  $^{125}\text{I}$ -ASOR の internalization 量は急速に増加し、 $1 \times 10^6$  細胞あたり 32 ng の ASOR が取り込まれた。M(F) 細胞では Wt 細胞に比べるとリガンドの internalization される速度がわずかに低下していたが、M(A)、M(d)細胞ではリガンドの internalization が顕著に低下していた。M(A)、M(d)細胞のエンドサイトーシス活性が完全には消失しないことから、Tyr-5 は all-or-nothing 型のシグナルではないと考えられる。また、incubation time 60分以降、各種トランスフォーマントへのリガンドの internalization 速度が低下しているように観察されるのは、 $^{125}\text{I}$ -ASOR が medium 中へ分解物として急激に放出されてくるためだと考えられる (11)。以上より、Tyr-5 が リガンドの rapid internalization のシグナルとして必要であり、その作用は Phe でもある程度代用できると考えられた。

Fig. 2-6

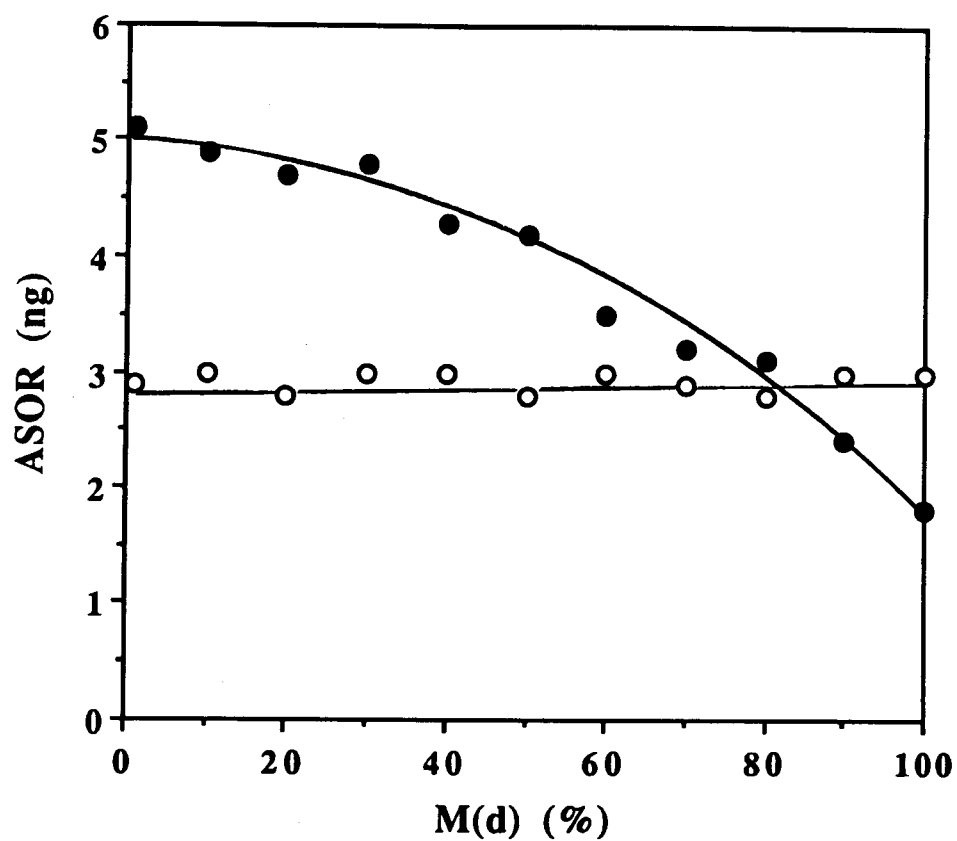


#### Fig.2-6 Time course of $^{125}\text{I}$ -ASOR internalization

Transfected COS-1 cells [○, Wt; ●, M(F); △, M(A); ▲, M(d)] ( $1 \times 10^6$  cells) were incubated with  $^{125}\text{I}$ -ASOR at 37°C for the indicated times, and then the amount of specific internalization was determined as described under "Experimental Procedures." The amount of specific surface binding, measured after incubation at 4 °C for 60 min, was almost identical for all types of transformed cells (data not shown).

#### 第4節 野生体とTyr-5 欠失体 cDNA の COS細胞への co-transfectionによるエンドサイトーシス活性の評価

M-ASGP-BP は6～8個の同一サブユニットからなるホモオリゴマー構造タンパク質であり、その細胞質領域のチロシン残基がリガンドの rapid internalization に必要であった。そのinternalization のために、すべてのサブユニットにチロシン残基（1分子あたり6～8シグナル）が必要とされるのかどうかを調べるために以下の実験を行った。つまり、野生体およびTyr-5 欠失体 cDNA を様々な比率でミックスし、COS-1 細胞に対して導入するco-transfection 実験を行った。野生体 に対するTyr-5 欠失体 cDNA の割合を変化させても、ASOR の細胞表面結合量（4°C、1時間の incubation）はほとんど変わらず、この変異がレセプターの細胞表面発現量には影響を与えないといえる。一方、37 °C、20 分間 incubation 後のinternalization されたりリガンド量は、Tyr-5 欠失体 cDNA の割合の増加と共に減少していった(Fig.2-7)。これらの結果より、各サブユニットのTyr-5はレセプター分子のinternalization に対し相加的に作用しているといえる。ただし、レセプター分子（6サブユニットモデルとした場合）の rapid internalizationのためには1分子あたり3個以上のチロシン残基が必要であると解釈することもできる。各サブユニットに存在する Tyr-5が rapid internalizationに及ぼす影響に関する定量的解釈は以下の考察と総括にて詳細に述べる。



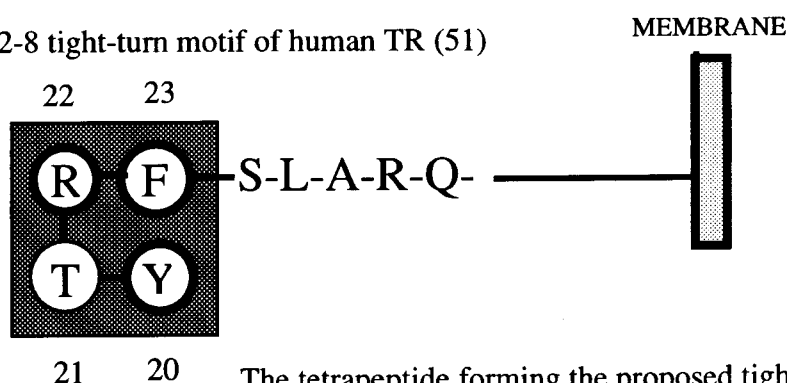
**Fig.2-7 Co-transfection with wild-type and Tyr-deleted mutant cDNAs.**

Plasmids containing the wild-type cDNA and the deleted mutant cDNA were mixed in various ratios. Mixed plasmids (5  $\mu$ g) were transfected into COS-1 cells ( $1 \times 10^5$ ) by means of the calcium-phosphate precipitation method. The amounts of specific binding (○) and internalization (●) were determined as described under "Experimental Procedures."

## 考察と総括

レセプター仲介エンドサイトーシスの過程でレセプターが形質膜上クラスリン被覆ピットに濃縮される際、アダプタータンパク質が形質膜にありそれがレセプターと相互作用すると考えられている。そして、レセプター側の細胞質領域にその標的部分があり、特に細胞質内のチロシンがエンドサイトーシスの効率に大きな影響を与えているとされる (49)。また、そのチロシンがシグナルとして機能するかどうかは、細胞質ドメインにおける三次元構造、空間配置も重要である。トランスフェリンレセプター (TR) (type II 膜タンパク質) の internalization signal であるとされる Tyr20-X-Arg-Phe23 に類似した10個のテトラペプチドについての Collawn らによる computer search によれば、そのうちの8個までが type I turn に類似した **tight-turn 構造**をとっていた (Fig. 2-8)。また、low-density lipoprotein receptor (LDLR) (type I 膜タンパク質) の internalization motif とされる Asn804-Pro-X-Tyr807 に関しても5個のテトラペプチドのうちの4個がそうであった (51)。チロシン残基の internalization signal としての重要性は、様々なエンドサイトーシス型レセプターについて研究されており、cation-independent mannose 6-phosphate receptor (52)、polymeric immunoglobulin receptor (53)、lysosomal membrane glycoprotein と lysosomal acid phosphatase (54, 55) などで報告されている。さらに、チロシン残基を人工的にインフルエンザウイルスの hemagglutinin (HA) や glycophorin A の短い細胞質領域に導入することによって、これらの細胞表面タンパク質が細胞内へ internalization するようになったとの報告もある (56, 57)。

Fig.2-8 tight-turn motif of human TR (51)



The tetrapeptide forming the proposed tight-turn motif is shown inside a striped rectangle with darker circles indicating the 3 functionally critical residues, which have aromatic and hydrogen-bonding characteristics.

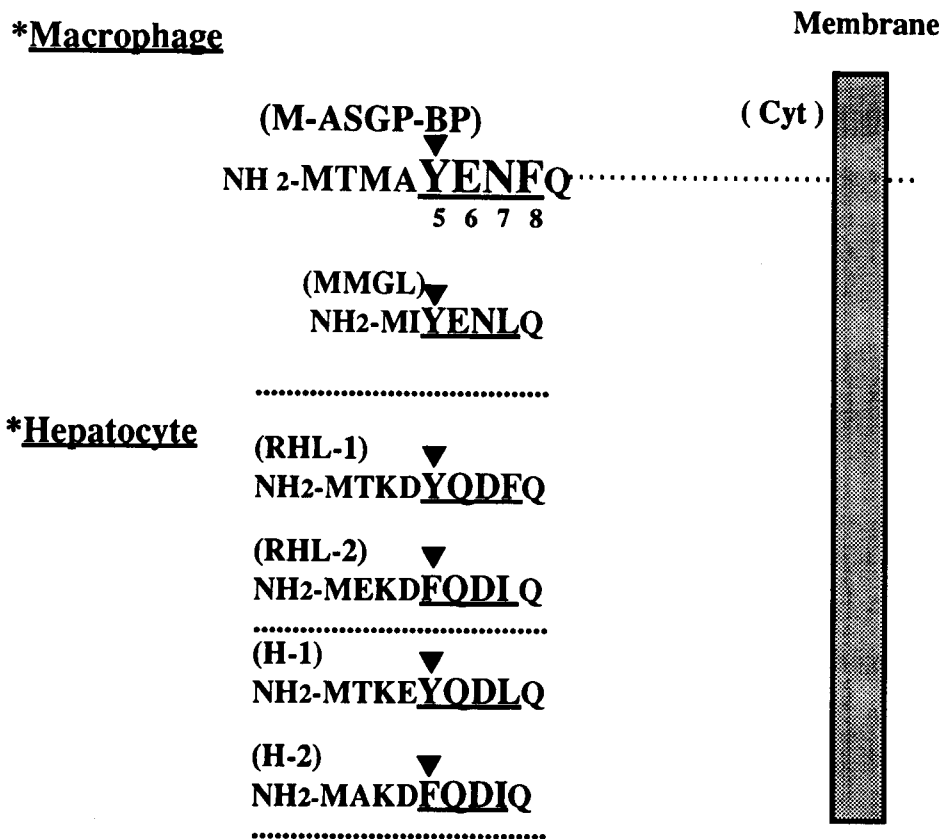
肝 ASGP-BP の internalization signal に関してもいくつか報告がある。ラット肝 ASGP-BPは構造的に類似している異なるサブユニット、RHL-1(主要成分)とRHL-2/3(少数成分)から構成されており、レセプターとしての機能発現には両サブユニットが必要不可欠である(11)。ヒト肝ASGP-BPも2個の関連したポリペプチド鎖(H1とH2)からなるヘテロオリゴマーとして機能する(13)。これらの主要成分(H1およびRHL-1)はN末5番目の位置にチロシンを共にもっている。しかしながら、少数成分、H2とRHL-2/3はその位置にチロシンはなく、フェニルアラニンをもっている(Fig.2-9)。Geffen らによれば、主要成分H1だけでは高親和性のリガンド結合能はないが、通常のエンドサイトーシスやリサイクリングのためのシグナルはH1単独で十分であるという(58)。また、主要成分H1のTyr-5をAlaに変異させると、トランスフェクトした線維芽細胞への internalization 速度は1/3に低下し、この事実はTyr-5がエンドサイトーシスのためのシグナルの一部を担っているということを示唆していた(59)。

著者は、本章において以下のことを明らかにした。

1) 組み換え rM-ASGP-BP が唯一の細胞内チロシン (Tyr-5) をもち、これが急速な internalization に重要な役割を果たすこと。

2) その作用を Phe で大部分代用でき、Tyr-5 を欠失させてもエンドサイトーシス活性を顕著に低下させるものの完全には消失しないこと。

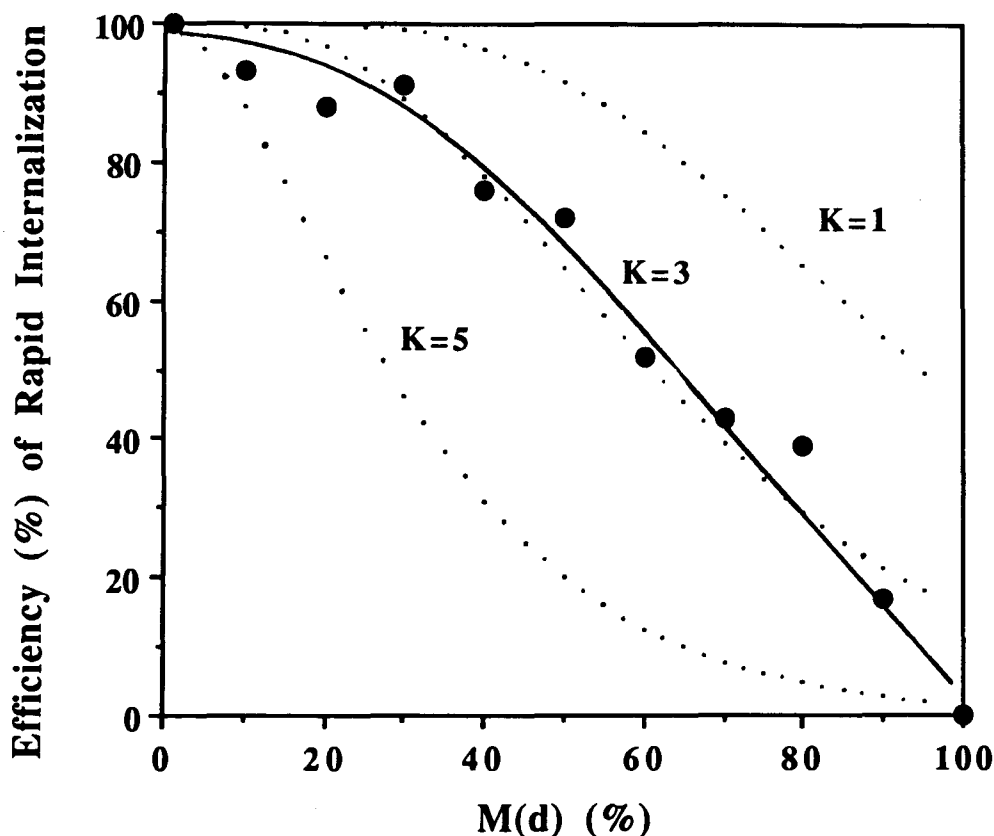
つまり、Tyr-5 は急速な internalization には必要であるが、存在しなくともエンドサイトーシスは起こりうるというものである。これらの全ての結果は、その他のエンドサイトーシス型レセプターの細胞質シグナルがアダプタータンパク質に認識され被覆ピットに濃縮される過程で論じられている事実と一致していた(49)。また、マウスのマクロファージ Gal/GalNAc 特異的レクチンはN末から3番目にチロシンを持っている(60) (Fig.2-9)。



**Fig.2-9 Crucial amino acid residues in the cytoplasmic tail of the ASGP-BP for rapid internalization.**

The tetrapeptides which may have a tight-turn conformation are underlined. The closed arrowheads indicate aromatic amino acids regarded as being of critical importance as internalization signals. MMGL, mouse macrophage Gal/GalNAc specific lectin.

野生体と Tyr-5 欠失体 cDNA とのco-expression 実験は、Tyr-5 が internalization signal として相加的、連続関数的に機能するかどうかを調べるためである。つまり、各レセプター分子に存在する野生体サブユニットの数に応じた速度でヘテロオリゴマーが internalization されるのか（モード1）？ または、all-or-nothing タイプで機能し、レセプター分子にとって迅速な internalization に必要十分な Tyr-5 の数があるのか（モード2）？



**Fig.2-10 Comparison of experimental data with the theoretically predicted curves for internalization of the heterooligomeric receptor.**

The theoretical curves were calculated with the Poisson distribution function,  $P = \frac{(e^{-\lambda}) (\lambda^K)}{K!}$ , where  $\lambda$  is the average number of mutant subunits for all the receptor molecules,  $K$  is the number of wild-type subunits in a given receptor molecules, and  $P$  is the percentage of the receptor molecules containing  $K$  wild type subunits for the assigned value of  $\lambda$ . The upper, middle, and lower curves represent the calculations based on the assumption that the presence of one, three, and five wild-type subunits in the molecule (which is assumed to be a hexamer here) is necessary for rapid internalization, respectively. The experimental values (●) were taken from Fig.2-7. The values in Fig.2-7 were recalculated taking the amounts of ASOR internalized by the wild-type and mutant receptors as 100 and 0%, respectively.



Fig.2-7に示す結果は、モード1を支持していた。つまり、レセプター分子に占める野生体の数の減少に応じて、internalization 速度も低下していた。一方、モード2で評価しようとする、トランスフェクションしたcDNA の比率に応じて、何個の野生体サブユニットをもったレセプター分子がどれだけ存在するかという分布曲線が必要になる。これを、Poisson 分布方程式によってFig.2-10の様に表すことができ、モード2による検討を行った。図にはレセプター分子が急速なinternalizationをするために、6量体モデルで6個のサブユニットのうち野生体がそれぞれ1個以上、3個以上、5個以上(野生体数;  $K=1, 3, 5$ ) 存在することが必要であるという仮定が成立する場合の理論曲線を点線で示してある。これらを実線で示した実験に基づく曲線と比較すると、野生体サブユニット数が3個( $K=3$ )の理論曲線によく一致している。これらの結果から、レセプター分子の迅速なinternalization には3個以上のTyr-5、すなわち全サブユニットのTyr-5の半分以上がそうであることが必要であり、そのシグナルは1個では不十分であるが5個は必要としないといえることができる。今回得られたデータのみから、モード1あるいはモード2のどちらの立場の解釈をとるべきかは判断できないが、迅速なinternalization にはレセプター1分子に多数(3個かそれ以上)のTyr-5が必要であることが示唆された。ところで、今回のco-expression 実験を通じての前提は、トランスフェクションした野生体と変異体 M-ASGP-BP cDNA の混合物が、その cDNA 量を反映した割合で2種類のサブユニットからなるヘテロオリゴマーを生じ、野生体あるいはTyr-5欠失体のみからなるそれぞれのホモオリゴマーは生じないということである。この前提は直接的に証明されていないが、これら2種類のサブユニットは選択的に self-association はしないと考えられる。というのも、オリゴマー形成にはサブユニット間の disulfide 結合と細胞質ドメインから離れた細胞外ドメインに位置する $\alpha$ -helical coiled-coil 構造による疎水結合が関与していると考えられているからである。

本章では、著者らはまずrM-ASGP-BPがN末のMetのみが除かれたTyr-5を含む完全な細胞質領域をもっていることを示した。この結果は以前、腹腔マクロファージより単離精製したM-ASGP-BPについての結果に反していた。一方、ラット腹腔マクロファージのASORに対する Kuptake 値 (23 nM) は、トランスフェクションした細胞で測定した値 (12.5 nM) に類似していた(11)。これらの事実からマクロファージの M-ASGP-BPもまた細胞表面上ではTyr-5を有していることが示唆される。ただし、Tyr-5を欠失したレセプターであっても、腹腔マクロファージにおいては野生体と同様に機能するかどうかについては不明である。

また、Tyr-5はリン酸化をされていることを示したが、internalization シグナルは Phe で大部分代用（約 80%）できることからチロシン残基のリン酸化は エンドサイトーシス に大きく影響を与えないと考えられた。しかし、Fallon, R. J. らによればチロシンリン酸化酵素阻害剤が肝臓のASGP-R のエンドサイトーシス活性を低下させ、エンドサイトーシスにおけるチロシンリン酸化の関与が示唆されている(61)。また、Phe-5 体ではチロシンリン酸化酵素阻害剤がエンドサイトーシス活性に影響を与えないという結果をえている。

ところで、シグナル伝達型レセプターの一つであるインスリンレセプター (IR) のエンドサイトーシスでは、2段階モデルが提唱されている(62)。つまり、第1段階では、インスリンの結合によりIR が微絨毛からinternalization がおこる被覆ピットのある形質膜まで再分布する。この段階では、リガンド依存的なチロシンリン酸化酵素の活性化、及び自己リン酸化が必要とされる。次にクラスリン被覆ピットでおこるinternalizationが第2段階であり、この時にはチロシンリン酸化酵素活性は関与せずinternalization シグナルのみが必要であるというものである。

以上のことから、ASGP-R についてもエンドサイトーシスの2段階モデルをあてはめれば、Phe体のエンドサイトーシスの80%の代用は、構造的に芳香族アミノ酸であるということでinternalization シグナルとしては十分機能するが、チロシンリン酸化を受けないため第1段階に影響が出てくると考えられる。さて、ASGP-R はリガンド結合の有無によらずエンドサイトーシスされるリサイクリング型レセプターであり、それ自身にチロシンリン酸化酵素活性をもたないので、その活性はいったいどこからやってくるのか？ 最近 Fallon, R. J. らが、ヒト肝腫瘍培養細胞 Hep G2において肝ASGP-R がチロシンリン酸化酵素活性を有すると思われる127 kDa のタンパク質 (p 127) と結合していることを明らかにした(63)。従って、M-ASGP-BPのエンドサイトーシスにおいても同様にチロシンリン酸化活性の関与が考えられ、それがシグナル伝達型レセプターの場合と異なるものなのかどうか、今後明らかにされていくと思われる。

## 実験方法（第2章）

### 1、試薬

制限酵素などの DNA操作のための試薬はタカラ酒造（京都）から購入した。アシアロオロソムコイド(ASOR)は、アメリカ赤十字社の M.Wickerhauser 博士より恵与されたOR より 1章の実験方法の通りに調製した(7)。Sodium [ $^{125}$ I] iodide (carrier-free) はAmersham Corp. から、そして[ $^{35}$ S] Protein Labeling Mix は DuPont-New England Nuclear Research Products から購入した。各 protease inhibitor についてはchymostatinと leupeptin をペプチド研究所（大阪）から、Aprotinin を Sigma 社から、p-toluenesulfonyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) をナカライテスク（京都）から Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)を和光純薬工業（大阪）から購入した。脱リン酸化酵素阻害剤であるSodium orthovanadate と Phenylarsine oxide (PAO)は、それぞれ和光純薬工業（大阪）及びSigma 社より購入した。

### 2、Site-directed mutagenesis

Tyr-5 から Ala および Phe への置換体、または Tyr-5の欠失体 cDNAは、M13mp18 にクローニングされたM-ASGP-BP cDNA (MC 9) (10)に対して、Mutan-Kキット[タカラ酒造(京都)]を用いてoligonucleotide-directed mutagenesis (64)を行うことにより作製した。変異を含む24 oligonucleotide は、次の3種類をApplied Biosystem DNA Synthesizer (Model 391 PCR MATE EP) により合成した。

5'-CTGGAAGTTTTTC-TGCCATTGTCAT-3' [-ATA (Tyr) ]

5'-CTGGAAGTTTTTCAGCTGCCATTGT-3' [ AGC (Ala) ]

5'-CTGGAAGTTTTCAAATGCCATTGT-3' [ AAA (Phe) ]

また、変異の存在の有無は、DNA sequencing により確認した。

### 3、プラスミドの構築

変異を確認できた、各cDNAクローンを第1章の実験方法と同様にpdKCR (11) に組み込んだ。

#### 4、細胞培養とトランスフェクション

COS-1 細胞 (Japanese Cancer Research Resources Bank (Tokyo) から恵与) は、10 % fetal calf serum (GIBCO) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (日水製薬) 中、CO<sub>2</sub> incubator (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) にて培養した。COS-1 細胞へのトランスフェクションは、第1章に記述した様に塩化セシウム密度勾配法にて2回精製した各種 plasmid DNA (5 µg) を、 $1-10 \times 10^5$  cells / 35mm well に対してリン酸カルシウム共沈法により導入した (11)。Tyr-5 を Ala 及び Phe に置換、または欠失させた変異 cDNA をトランスフェクションした細胞を、Wt (野生体) に対してそれぞれ M(A)、M(F)、M(d) 細胞とした。Co-transfection 実験は、wild-type cDNA と欠失体 cDNA を様々な割合で含むプラスミド混合物 (total : 5 µg) を用いて行った。

#### 5、rM-ASGP-BP の N 末分析

野生体 M-ASGP-BP cDNA をトランスフェクションした細胞 ( $2 \times 10^7$  cells) を <sup>35</sup>S - アミノ酸でラベルして (11)、2 % Triton X-100, 100 µg/ml PMSF, 100 µg/ml TPCK, 3 µg/ml chymostatin, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 0.5 mM EDTA, 0.4 M KCl を含む 0.01M imidazole-HCl (pH 7.8) buffer に懸濁させた。次に、この懸濁液を 4°C、30 分間攪拌し、遠心によって可溶化タンパク質を回収した。rM-ASGP-BP は、1 章で述べた (11) ように Sepharose 4B-ASOR column の affinity chromatography による精製を 2 回繰り返し得た。つまり、溶出液の放射活性を含む画分を分取し、50 % の trichloroacetic acid (TCA) を終濃度が 10 % になるように加えた。氷上で 30 分静置した後、懸濁液を 10,000 rpm で 5 分間遠心した。回収した沈殿を 5 % TCA で洗浄し、更に 0.04 M sodium acetate を含む 80 % ethanol で 1 回、90 % ethanol で 3 回洗浄を繰り返した。洗浄した沈殿物を水に溶解し、Protein Sequencer (Applied Biosystems 477A) で分析した。

#### 6、リン酸化チロシンの検出

トランスフェクション後、60 時間の Wt 細胞と M(d) 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells / 10cm dish) を phosphatase inhibitor (20 µM phenylarsine oxide (PAO) および 200 µM sodium orthovanadate) 存在下または非存在下 37°C で 1 時間培養した。

次に、氷冷したPBSで細胞を洗浄した後、50  $\mu$ M PAO及び500  $\mu$ M sodium orthovanadateを含むLysis buffer (1章参照)で可溶化し(11)、Sephacrose 4B-ASORのaffinity chromatographyで野生体と欠失体 rM-ASGP-BPを精製した。各精製品をSDS-PAGE (12.5 % gel)で分離後、一方は銀染色により発現タンパク質を確認した。また他方は、Western blot用として電気泳動後PVDF膜に転写し、一次抗体に2,000倍希釈した抗リン酸化チロシン抗体 PY 20 (Chemicon社)、二次抗体に500倍希釈したhorseradish peroxidase (HRP) 標識した anti mouse Ig G (ZYMED LABORATORIES, INC.)、基質には4-chloro-1-naphtolを使い発色させてリン酸化チロシンを検出した。

#### 7、 $^{125}$ I-ASORのBindingおよびInternalizationの定量

ASORはGreenwoodらのchloramine-T法によりヨードラベルした(45)。トランスフェクション後60時間の細胞 ( $1-10 \times 10^5$ /35mm well)に対して1章に述べられている方法でASORのbinding, internalization実験を行った。細胞を2 $\mu$ g/mlの $^{125}$ I-ASOR(1ml/well)と4°C、1時間 incubateした後、PBS 1mlで3回洗浄し各wellに1mlの0.1 M-NaOHを加え、細胞を溶解し結合放射活性をBeckman  $\gamma$ -5000 counterにて測定した。また、internalization実験は2 $\mu$ gの $^{125}$ I-ASORを含むDMEM (prewarmed at 37°C) 1mlを、トランスフェクションした細胞に加え37°C、20分間、あるいは図に示す時間 incubationした後、5 mM EDTAを含むPBSで氷上3回洗浄後、各wellに1mlの0.1M-NaOHを加え放射活性を測定した。また、ブランク（非特異的結合と取り込み）は100モル過剰のラベルしていないASORまたは5 mM EDTA存在下決定した。特異的結合とinternalizationは、それぞれのサンプルについてのブランクの値を引いたものを計算した。一端結合したリガンドが37°C加温後にどのように分布するかを調べるため、細胞表面レセプターに $^{125}$ I-ASORをあらかじめ結合飽和させた(4°C、1時間)後、37°Cに加温したmediumを加えて改めてCO<sub>2</sub> incubatorで37°C、20分間培養した。リガンドの分解産物は第1章に述べたように酸可溶性放射活性として決定した。また、20 mM EDTAによる洗浄で遊離する放射活性は細胞表面結合リガンド量として、EDTA洗浄後 0.1 M-NaOHで溶解される放射活性はinternalizationしたリガンド量とした。

### 第3章

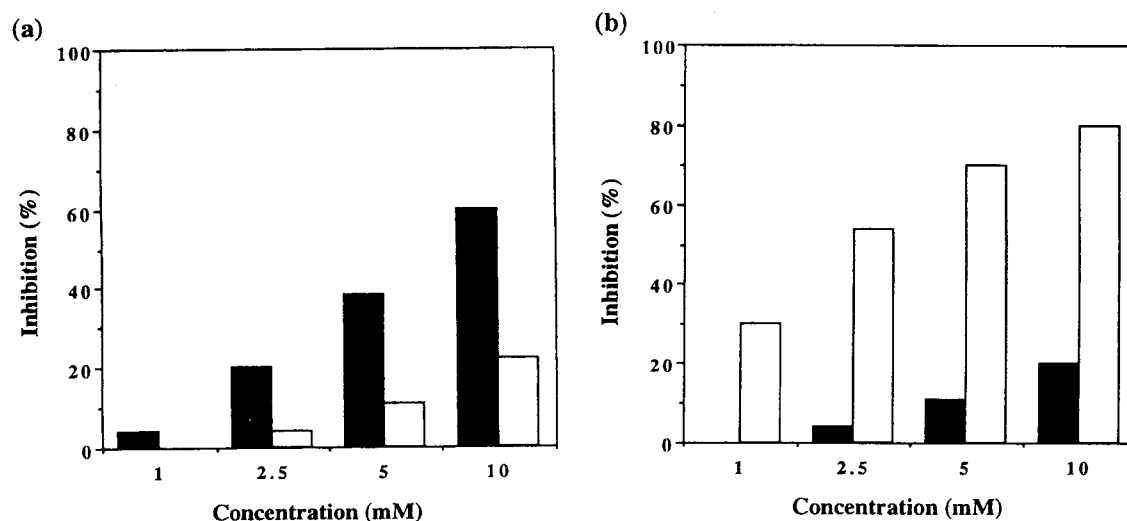
#### ラット腹腔マクロファージのガラクトース／N-アセチルガラクトサミン特異的レクチン(M-ASGP-BP)の糖鎖結合特異性の解析 (肝レクチンとの比較)

ある特定の3本鎖(triantennary)糖鎖構造が、肝臓ASGP-Rに最適のリガンドであると言われている (ゴールデン・トライアングル) (65)。また、triantennary糖鎖の3個のGal残基のそれぞれを別個にphotoaffinity 標識試薬で修飾した誘導体を作製し、これをプローブとしてRHLとの反応性を調べたRiceらの報告(39)によれば、特定の1つのGalがRHL-2/3に結合し残りの2つのGalがRHL-1に特異的に結合していた。このことは、3個のGalは決してランダムにASGP-Rのサブユニットに結合するのではなく、2種のサブユニットにより構築された糖認識ドメイン(CRD)に特定の空間配置を保ちながら結合することを示している。逆に、CRDの相対的な空間配置が異なれば、糖結合特異性に大きな変化をもたらすと考えられる。ところで、RHLは4個のRHL-1と2個のRHL-2/3のヘテロヘキサマーからなるASGP-Rとして機能すると考えられているが(35, 38)、M-ASGP-BPは単一サブユニットからなるホモヘキサマーとして機能することを著者は証明した(11)。従って、両者にはその糖鎖結合特異性に差異があると考えられた。

第3章では、マクロファージASGP-Rと肝臓ASGP-Rのそれぞれの糖鎖結合特異性を比較検討した。すなわち、COS細胞に発現させることでレクチンシグナルを増強したrM-ASGP-BPとヒト肝腫瘍細胞Hep G2細胞にはほぼ正常肝レベルで発現しているヒト肝レクチン(HHL)に対して、各種阻害物存在下<sup>125</sup>I-ASORの結合阻害実験を行った。阻害物としては、Gal-BSA、GalNAc-BSAといったネオ糖タンパク質や、価数の異なる合成・天然多価糖鎖リガンドを用いた。その結果、HHLは天然の血清型糖タンパク質のもつ3本鎖型糖鎖に最も強い親和性を示したのに対し、rM-ASGP-BPは糖と糖がつくる空間配置が天然型3本鎖糖鎖よりも大きい合成糖鎖リガンドの方に更に強い親和性を示した。また、本来、両レクチンはGalおよびGalNAc特異的であると考えられてきたが、HHLはGalNAcに、rM-ASGP-BPはGalにより特異的であった。また、糖結合特異性において観察された相違点は、サブユニットの構成や糖認識部位の空間配置の相違を反映していると考えられた(16)。

# 第1節 アグリコン（非糖部分）をもつ単糖による組み換えM-ASGP-BP (rM-ASGP-BP)およびヒト肝癌細胞 Hep G2 細胞に対するアシアロ糖タンパク質結合阻害実験

第1章で示したように、rM-ASGP-BP に対する  $^{125}\text{I}$ -ASOR の取り込み阻害実験では GalNAc の方がわずかに Gal よりも阻害効果が大きかった。すなわち、37°C での 50% 取り込み阻害濃度 ( $I_{50}$ ) の値は、GalNAc および Gal ではそれぞれ 10 mM、17 mM であった (11)。本章では、さらに詳細に Gal と GalNAc の相対的な親和性を比較するため、アグリコン（非糖部分）をもつ単純な糖（非還元糖）Gal-AH-TFA と GalNAc-AH-TFA を阻害物に用いた。Fig.3-1 に示すように、COS-1細胞に発現させた rM-ASGP-BP に対する  $^{125}\text{I}$ -ASOR の結合は、8 mM の Gal-AH-TFA 存在下 50 % 阻害されたが、10 mM の GalNAc-AH-TFA 存在下ではほんの 20 % しか阻害されなかった。一方、Hep G2 細胞に発現している肝レクチン(HHL) への  $^{125}\text{I}$ -ASOR の結合は、2 mM の GalNAc-AH-TFA で 50 % 阻害され、10 mM の Gal-AH-TFA では 20 % 以下の阻害効果であった。これらの事実は、明らかにマクロファージ ASGP-BP は GalNAc よりも Gal の方に、HHL は Gal よりも GalNAc の方に高い親和性をもつことを示していた。従って、還元糖（単糖）を阻害物として用いた前述の実験 (11) では正確な結果が表れなかったが、それは還元糖が様々な構造で存在しうるためだと考えられる。



**Fig.3-1 Inhibition of  $^{125}\text{I}$ -ASOR binding to rM-ASGP-BP and HHL by monosaccharide glycosides.**

Inhibition of  $^{125}\text{I}$ -ASOR binding to (a) rM-ASGP-BP on COS-1 cells and (b) HHL on Hep G2 cells by monosaccharide glycosides, Gal-AH-TFA ( closed bar ) and GalNAc-AH-TFA (open bar ), was determined as described under "Experimental Procedures".

## 第2節 ネオ糖タンパク質による組み換えM-ASGP-BP (rM-ASGP-BP)およびヒト肝癌細胞 Hep G2 細胞に対するアシアロ糖タンパク質結合阻害実験

結合親和性に対する糖密度の影響を調べるために、ネオ糖タンパク質、Gal<sub>n</sub>-BSA および GalNAc<sub>n</sub>-BSA存在下阻害実験を行った。Fig. 3-2 には各阻害物による結合阻害効率 (%) を、横軸の阻害物濃度 (μM)の対数スケール に対してプロットしたものである。Gal<sub>31</sub>-BSA と GalNAc<sub>35</sub>-BSA による、<sup>125</sup>I-ASOR の COS-1細胞上の rM-ASGP-BP と Hep G2 細胞上の HHL への結合阻害曲線をそれぞれ Fig. 3-2 (a) と (b) に示している。その他のネオ糖タンパク質、Gal<sub>8</sub>-、Gal<sub>10</sub>-、Gal<sub>23</sub>-、Gal<sub>41</sub>-BSA および GalNAc<sub>8</sub>-、GalNAc<sub>16</sub>-、GalNAc<sub>26</sub>-BSA についても同様の曲線が得られた (data not shown)。

また、Fig.3-3 は、BSA 上の糖残基数の密度に対して、Fig. 3-2の様な曲線から計算された  $I_{50}$  の値をプロット したものである。rM-ASGP-BP への結合に対する  $I_{50}$  の値は、Gal<sub>8</sub>-、Gal<sub>10</sub>-BSAではそれぞれ 3 および 0.7 μM であったが、Gal<sub>23</sub>-、Gal<sub>41</sub>-BSA ではおよそ 0.05 μMであった。従って、Gal 密度がおよそ 2 ～ 3 倍増加すると、結合親和性は 50 倍以上増大することになる。類似の効果が GalNAc-BSA についても観察された。また、すでに第1節で述べた結果と同様、糖密度によらずM-ASGP-BP は Gal に、HHLは GalNAcにより高い親和性を示した。

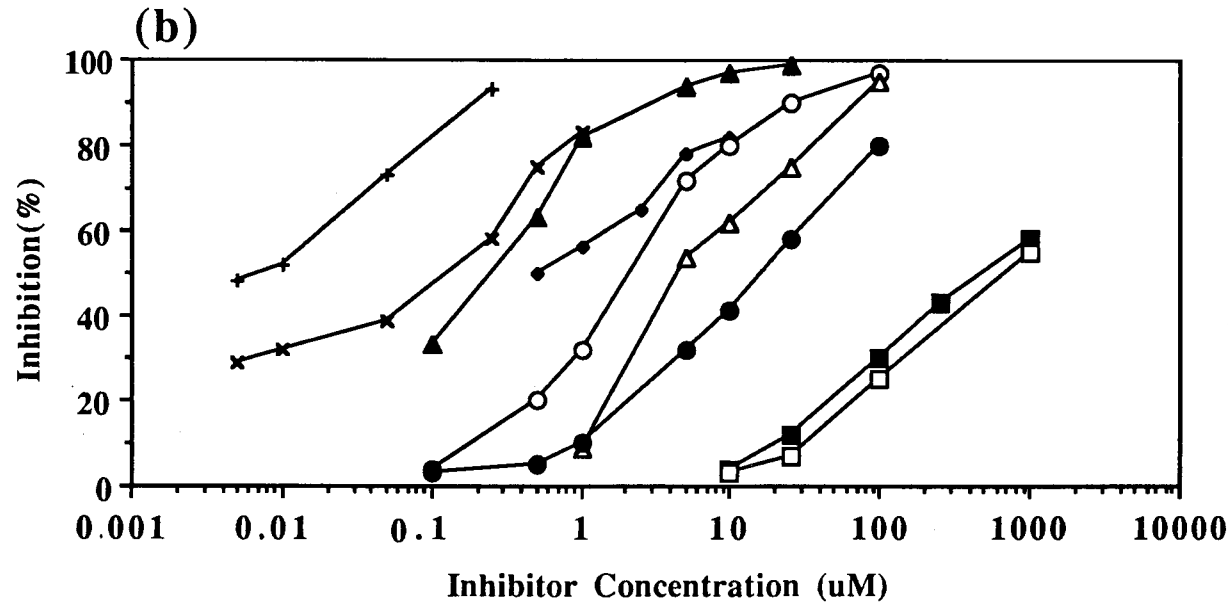
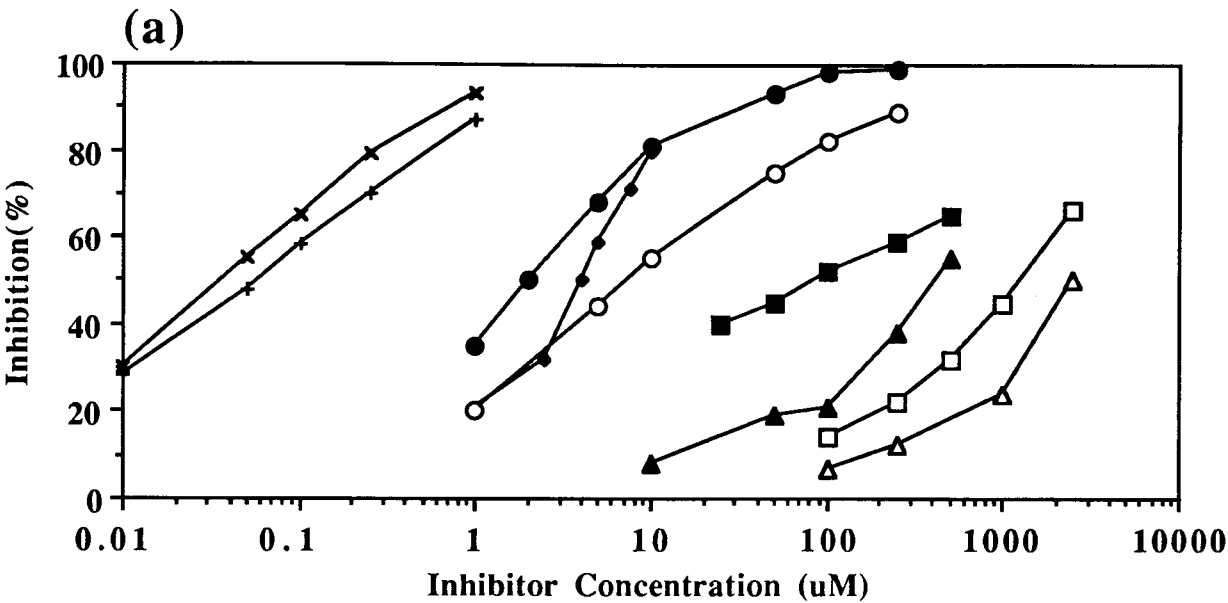
### Fig. 3-2 Inhibition of <sup>125</sup>I-ASOR binding to rM-ASGP-BP and HHL by neoglycoproteins and cluster glycosides.

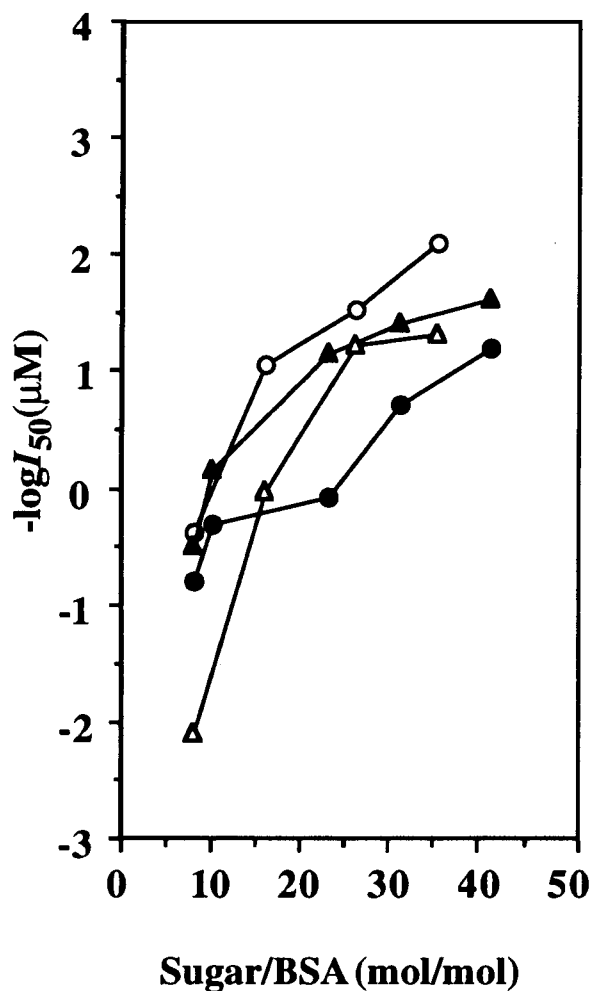
Inhibition of <sup>125</sup>I-ASOR binding to (a) rM-ASGP-BP on COS-1 cells and (b) HHL on Hep G2 cells by neoglycoproteins and cluster glycosides was determined as described under "Experimental Procedures".

Gal<sub>31</sub>-BSA (×), GalNAc<sub>35</sub>-BSA (+), di-tris-Lac (○), YEE(LacAH)<sub>3</sub> (●), YEE(GalNAcAH)<sub>3</sub> (▲), TAGP (◆), tris-LacAHT (□), D(LacAH)<sub>2</sub> (■), NAcYD(G-GalNAc)<sub>2</sub> (△)



Fig. 3-2





**Fig. 3-3 Inhibitory potency ( $I_{50}$ ) of various Gal- or GalNAc-containing neoglycoproteins.**

Inhibition of  $^{125}$ I-ASOR binding to rM-ASGP-BP on COS-1 cells ( triangle) and HHL on Hep G2 cells ( circle) by neoglycoproteins [ Gal-BSA (solid symbol) and GalNAc-BSA (open symbol) ] was determined as described under " Experimental Procedures".

Concentration of a neoglycoprotein that causes 50 % inhibition of  $^{125}$ I-ASOR binding ( $I_{50}$ ) was plotted against the number of sugar residues per mole of BSA.

### 第3節 合成・天然多価糖鎖リガンドによるrM-ASGP-BPおよび Hep G2細胞に対するアシアロ糖タンパク質結合阻害実験

内部構造に糖をもたず、末端にのみ1糖単位または2糖単位で糖を含有するいわゆる簡略型クラスター糖リガンド(short-hand **cluster glycosides**, see Fig.3-4)は、哺乳類や鳥類の肝レクチンに対し極めて強い結合親和性の増大をもたらし、またこれらを用いた様々な報告がある(66, 67, 68)。そのような低分子リガンドを用いて、COS-1細胞上のrM-ASGP-BPとHep G2細胞上のHHLに対して阻害実験を行った。

本節で用いた、低分子で多価な合成糖リガンドは大きく2つのタイプに分類することができる。まず、第一のグループは **tris-** hydroxymethylaminomethane (69) を母体とした糖リガンドで、結合させた糖と糖との間の距離が短く、非常に近接している。このタイプの例として、tris-LacAHT (see Fig. 3-4)をあげれば糖と糖との距離 (inter-Gal distances) は約1.7 nmである。第二のタイプは、構造的にaspartic acid か  $\gamma$ -glutamyl glutamic acid に基づいており、結合させた糖から分岐点までが長い腕となり非常にフレキシブルである。Fig. 3-5 にあげた大部分のリガンドはこのタイプに属する (see Fig. 3-4)。このタイプの2価リガンドでは、分岐点から糖までの腕に連結するグリシン残基が1個から3個まで入ることでその長さは変化し、Gal-Gal間の距離は2.8 nm から 5.0 nm (see Fig. 3-5)までの範囲をとる。一方、di-tris-Lac (6価リガンド) は両方のタイプを含んでいる。

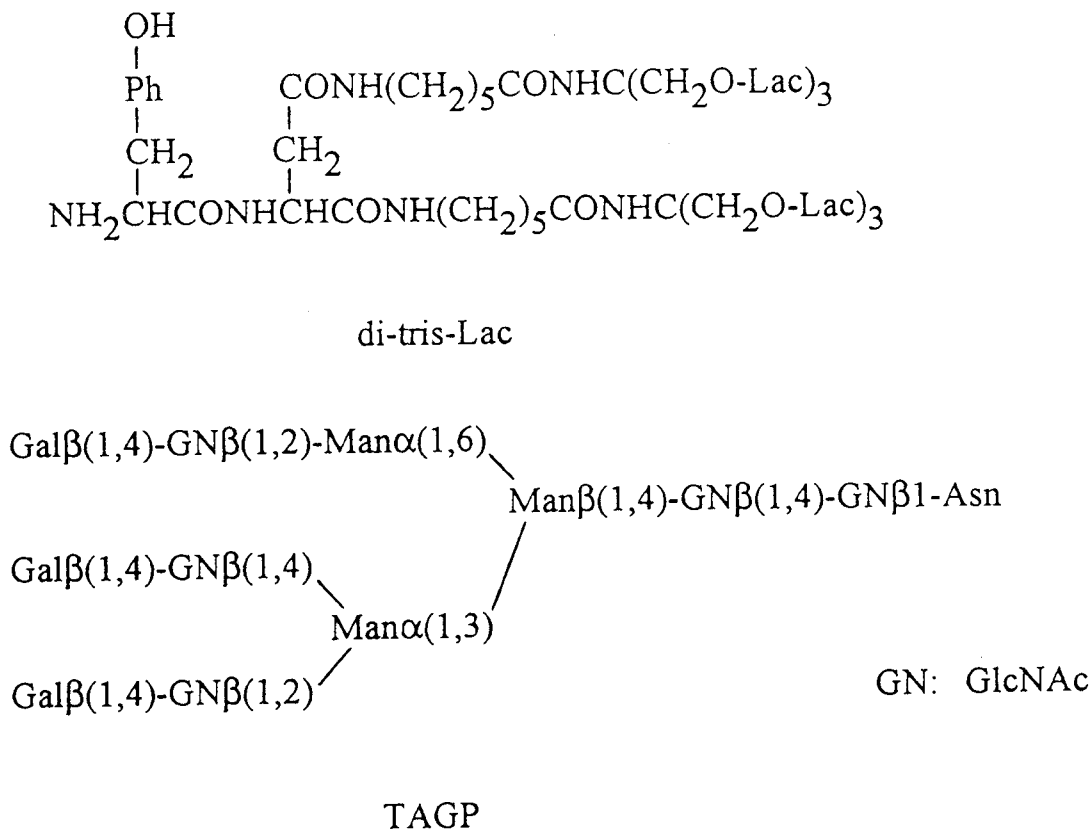
これらのクラスターリガンドによる阻害曲線は、Fig. 3-2 (a)と (b) に示してある。また、これらの曲線から得られた $I_{50}$ の値はFig. 3-5 にまとめた。Fig. 3-5には、以前行われたRHLのデータ(67)も対照としてつけ加えた。末端にGalをもつ様々なクラスターリガンドに対する親和性増強度 enhancement factor は、Gal-AH-TFAの親和性を1とし、それを基準にして計算した。そのためGal-AH-TFAの $I_{50}$ の値を、Fig. 3-1からrM-ASGP-BPについては約8 mM、HHLについては約50 mMとした。3種すべてのレクチンについて、多価リガンドは強力なクラスター効果を示した。すなわち、多価リガンドの価数の単純増加に対して、結合親和性の指数関数的な増大がみられた。(ただし、COS-1細胞上のrM-ASGP-BPに対するtris-LacAHTの親和性は例外である。)

Fig. 3-2とFig. 3-5に示すように、COS-1細胞上のrM-ASGP-BPに対しては3価のGalリガンドであるYEE(LacAH)<sub>3</sub>が低分子リガンドの中では最も親和性が高く、2価のGalリガンドであるD(LacAH)<sub>2</sub>よりも50倍も親和性が高い。

興味深いことに、D(LacAH)<sub>2</sub> は 3 価の tris-LacAHT よりも強力な阻害物であったが、このことは Gal 残基の空間的配置の重要性を指摘するものである。Fig. 3-2 (b) には、Hep G2 細胞上の HHL に対する合成糖リガンドの阻害曲線を示した。3 価の GalNAc リガンド YEE(GalNAcAH)<sub>3</sub> が低分子リガンド中最強で、2 価の GalNAc リガンド NAcYD(G-GalNAcAH)<sub>2</sub> の約 20 倍高い親和性を示した。ここでも、肝レクチンは Gal よりも GalNAc により強い親和性を示し、マクロファージではその逆になった。たとえば、HHL に対し 3 価の GalNAc リガンド [YEE(GalNAcAH)<sub>3</sub>] は、3 価の Gal リガンド [YEE(LacAH)<sub>3</sub>] より 60 倍強い阻害効果を示す。実際、YEE(GalNAcAH)<sub>3</sub> は Gal 残基を 6 個も含むリガンド di-tris-Lac よりもずっと強い阻害効果をもたらす。それとは対照的に、M-ASGP-BP に対しては YEE(LacAH)<sub>3</sub> が YEE(GalNAcAH)<sub>3</sub> よりも 200 倍も高い親和性を示す。

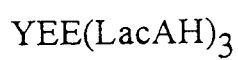
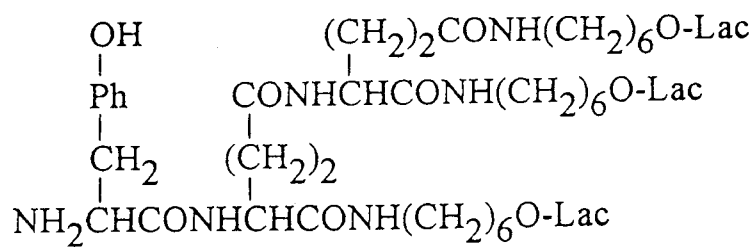
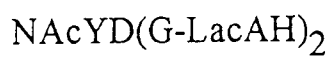
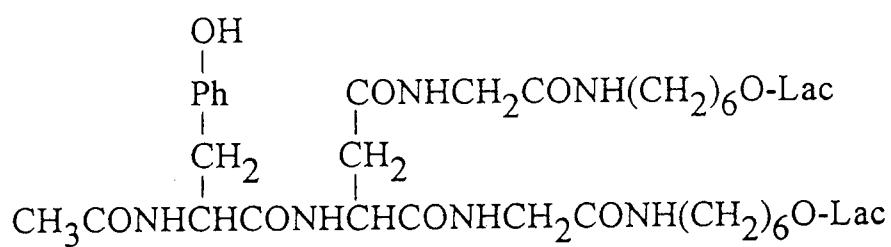
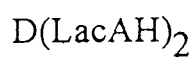
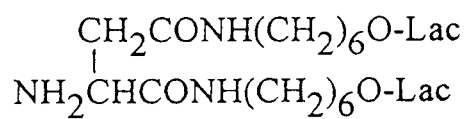
このように大部分の Gal リガンドの rM-ASGP-BP に対する親和性は、HHL に対するものと等しいかそれ以上であるにもかかわらず、TAGP は rM-ASGP-BP よりも HHL に対してより強く結合したことは興味深い事実である。以下考察と総括で論ずる。

Fig. 3-4 Structure of cluster glycosides





tris-LacAHT



Compound	Maximum inter-sugar distances (nm)	rM-ASGP-BP (COS-1)		HHL (Hep G2)		RHL (Hepatocytes)	
		$I_{50}$ ( $\mu$ M)	Enhancement Factor	$I_{50}$ ( $\mu$ M)	Enhancement Factor	$I_{50}$ ( $\mu$ M)	Enhancement Factor
Monovalent ligand Gal-AH-TFA		8000	1	$5.0 \times 10^4$	1	600	1
Divalent ligand							
D(LacAH) <sub>2</sub>	2.8	90	89	400	125	5.5	109
D(G-LacAH) <sub>2</sub>	3.5	22	360	50	1000	7	86
NAcYD(G-G-LacAH) <sub>2</sub>	4.2	160	50	150	330	14.5	41
NAcYD(G-G-G-LacAH) <sub>2</sub>	5.0	110	73	100	500	11	55
NAcYD(G-GalNAcAH) <sub>2</sub>	3.3	2500		4		0.003	
Trivalent ligand							
tris-LacAHT	1.7	1200	7	500	100	4	150
YEE(LacAH) <sub>3</sub>	3.3, 4.1, 4.3	2	4000	15	3300	0.05	$1.2 \times 10^4$
TAGP		4	2000	0.5	$1 \times 10^5$	0.007	$8.6 \times 10^4$
YEE(GalNAcAH) <sub>3</sub>	2.7, 3.3, 3.4	400		0.25		0.0002	
Hexavalent ligand di-tris-Lac		7	1140	2	$2.5 \times 10^4$	0.012	$5.0 \times 10^4$

**Fig. 3-5 Inhibition constant ( $I_{50}$ ) and enhancement factor of cluster glycosides.**

$I_{50}$  refers the concentration of an inhibitor to cause 50 % inhibition of  $^{125}$ I-ASOR binding. Enhancement factor was estimated by dividing the  $I_{50}$  values for the monovalent reference ligand (Gal-AH-TFA) by those for multivalent Gal-containing compounds. Data on the rat hepatocytes were from (67).

## 考察と総括

第3章では、ラット腹腔マクロファージ由来のGal/GalNAc 特異的結合タンパク質 (M-ASGP-BP)の糖鎖結合様式について解析した。このレクチンのポリペプチド構造はアシアロ糖タンパク質レセプター (ASGP-R)としてよく知られているラット肝レクチン (RHL) の主要成分 (RHL-1)と高いホモロジーをもっている。RHL-1と M-ASGP-BP 間に見られる主な構造的相違は、後者のネック (neck) 領域がかなり長くなっている (24 アミノ酸分) という点である(10)。M-ASGP-BP はホモオリゴマーレセプターを形成し、その単純な構造で肝細胞表面上の ASGP-Rと同様の性状を示す。

RHLやその他の哺乳類の肝レクチンでは、末端 Gal (GalNAc) 残基のみがその結合に寄与していると考えられ、GalNAc 残基はGal 残基よりも高い親和性を持っている(70)。これらのレクチンと単糖との結合力はかなり弱く、解離定数は0.1~1 mMの範囲である。ところが、生理的に意味をもつ結合力 ( $K_d \sim \text{nM}$ )を生み出す、つまりリガンドが細胞表面で結合しリガンド・レセプター複合体としてエンドサイトーシスされるためには、肝レクチンの各サブユニットがクラスター構造をとり多価である糖残基を認識しなければならない。このような理由から、本章ではネオ糖タンパク質と末端に6個までのGal/GalNAc 残基を連結させた低分子、合成リガンドの両方を多価リガンドとして用いた。

各リガンドの相対的な親和性は、M-ASGP-BPを発現しているCOS-1細胞プレートに対して阻害実験を行って評価した。また、ヒト肝レクチン (HHL) を細胞表面にもつHep G2 細胞は比較実験に用いた。Fig. 3-5に見られるように、RHL に対する  $I_{50}$  の値は HHL に対応する値よりもかなり低いものになっている。プレートに培養した細胞に対して得られた  $I_{50}$  の値は、かつてLee, Y. C.らが懸濁させたラット肝細胞に対して行った実験(67)で得られた値よりもはるかに高いようである。従って、 $I_{50}$  の値を基準にするのではなく、各細胞での相対的な阻害力からすべてを結論づけた。

前述したように、明らかにrM-ASGP-BPはGalNAcよりも Galの方に特異的である。この傾向はHHLとは全く逆であり、一般的に哺乳類の肝レクチンはGalよりもGalNAcの方に強い親和性を示す。実際 rM-ASGP-BPとHHLのすべての末端 Gal リガンドに対する親和性は全く対照的であった (Fig. 3-5)。

6 炭糖（ヘキソース）のC-2でのequatorial acetamido 基の存在（つまりGalNAc）はHHLとの親和性を増強するのに対し、rM-ASGP-BPに対する親和性はかなり低下させる。この結果は、M-ASGP-BPの糖結合領域 (CRD)における C-2 と接触する部位が哺乳類の肝レクチンのものとは異なっていることを示唆している。興味深いことに、哺乳類の肝レクチンはGal よりも GalNAcの方に強い結合親和性を示すが、その増強される程度にはかなり種差が認められる。単糖レベルの実験で、RHL に対してはGalNAcになると43 倍親和性が増大するが、ウサギの肝レクチンでは2.5 倍しか増強されない (67)。Fig. 3-1(b)から予想される $I_{50}$ の値から、HHLはRHLに非常に類似した性質をもっていると考えられる。

低分子でフレキシブルな多価リガンドを用いると肝細胞上のRHL、COS-1細胞上のrM-ASGP-BPおよびHep G2 細胞上のHHLすべてのレクチンが強いクラスター効果を示した (Fig.3-5)。以上の3つのレクチンについて、親和性の増大の程度を比較してみると、たとえば、2 価のGal リガンドであるD(LacAH)<sub>2</sub>の enhancement factor は、3 種のレクチンについて100 倍程度であったが、3 価のYEE(LacAH)<sub>3</sub>では3,000 から12,000 倍もの増強をもたらす。ネオ糖タンパク質の場合では、Fig. 3-3に示したようにすべてのレクチンに対する親和性は最初のうち BSA 上の糖残基数の増加とともに急激に増大するが、20 mol / mol BSA以上の糖密度からは増加率は低下してくる。

このように価数の変化が、トランスフェクションしたCOS 細胞やHep G2 細胞の親和性の増加に及ぼす影響については、すでによく調べられているRHLの系を参考にするといくつかは説明できる。界面活性剤で可溶化した肝レクチン (RHL, rabbit HL, chicken HL) はすべて安定な6 量体として存在するようである(71, 36, 72)。可溶化したrM-ASGP-BPもまた6~8個のサブユニットからなるオリゴマー構造として存在していた(11)。その様なオリゴマーには12個ないしはそれ以上の糖結合部位が存在しており(73)、高親和性多価リガンドに対して nMオーダーの $I_{50}$ の値を実現する。ラットおよびウサギの肝細胞表面でも、この6 量体が最小機能単位であると考えられるが、6 量体のさらなる凝集もおこりうるようである(74)。COS-1 細胞上のrM-ASGP-BP のオリゴマー構造については明らかではないが、単離された肝細胞上のRHLと同様にこれらの細胞でも低分子、高分子多価リガンドによるクラスター効果が見られる事実から、rM-ASGP-BPのサブユニットも肝細胞表面のRHLと類似した様式で凝集して存在していると考えられる。しかしながら、tris-LacAHT による rM-ASGP-BP へのクラスター効果が見られないのは、マクロファージレクチンの糖結合部位が、強固で密接に凝集した肝レクチンに比べると緩和な結合をしているということを示唆している。



このような理由から、さらに長く分岐した腕をもつリガンド[例えば、NAcYD (GGG-LacAH)<sub>2</sub>]を使用して、rM-ASGP-BPに対する親和性が増強されるかどうか調べた。しかし、その結果は予想外で、長腕はほとんど意味をもたなかった(Fig.3-5)。

すべての肝レクチンは、別個の遺伝子にコードされた2種類の異なるポリペプチド鎖から構成されている(36, 75)。RHL およびHHLにとって、天然のアシアロ糖タンパク質リガンドに対する強固な結合にこの両サブユニットの存在が必要である(12, 40)。Fig. 3-5 に示されるように、TAGP はラット肝細胞に対しnM オーダーの解離定数であらわされる親和性をもつ。TAGP 構造をもったリガンドによるラット肝細胞に対する阻害実験では、各 Gal 分岐リガンドよりも約 1,000 倍の親和性の増大を示した。その様な観察から、TAGP の 3 個のGal 残基のとりうる安定な構造がラット肝細胞上のRHL に存在する 3 個の糖結合部位の配置に相補的であると考えられた。その結果、Gal 残基が協調して結合し、各結合部位での結合力を結集し強力な全結合力を生み出す(76)。その上、TAGP 誘導体を用いたphotoaffinity ラベル実験では、RHL の 2 種類のサブユニットが肝細胞表面上、立体特異的かつ厳密に配置されているということを示していた(39)。Fig. 3-5 に見られるように、HHLの場合のTAGPによる親和性増強の程度は非常に大きく $\sim 10^5$ 倍であるが、COS-1 細胞上 rM-ASGP-BP では2,000倍の増強度で、これは合成 3 価リガンドYEE(LacAH)<sub>3</sub>によるものよりも小さくなっていた。従って、TAGP に存在するGal 残基の特徴的な配置がラット肝細胞と同様にHep G2 細胞に対しても効果的であるが、COS-1 細胞上の rM-ASGP-BPによる認識には特異的ではないと思われる。この様な3本鎖型糖鎖をもった糖タンパク質は、哺乳類の肝細胞による結合・エンドサイトーシスに対して最適なりガンドであるが、一方腹腔マクロファージレクチン (COS-1細胞上の rM-ASGP-BP) にはBSA ネオ糖タンパク質上のランダムな糖残基クラスターがちょうど適合するようである。しかしながら、M-ASGP-BPに対しより高い親和性で認識されるGal 残基をもった天然の特殊なオリゴ糖構造が存在する可能性もある。また、興味深いことに1種類のサブユニットのみからなる別のレクチン CHL に対しても、特殊なオリゴ糖構造から成る特異的なリガンドは確認されていない (68)。M-ASGP-BP の場合、ホモオリゴマー構造であることに加え、ネック領域の伸張 (10)が糖の認識、結合に対してフレキシブルに働くと考えられる。

チオグリコール酸培地による浸出性腹腔マクロファージ上のM-ASGP-BPの生理機能についてはあまり明らかになってはいないが、ある種の生体防御因子として作用するmannan-binding proteinの場合のように免疫反応に関与する可能性もあり(77, 78)、あの3本鎖構造で各Gal残基がつくる三角形よりもさらに大きい空間をM-ASGP-BPは認識するようにも思われる。免疫担当細胞であるマクロファージによる異物の認識・排除といった点から考えても、糖鎖構造特異性は低く、むしろリガンドが特定されず幅広く対応できる方が便利であろう。一方、肝臓ではクリアランスレセプターとして、血清中の糖タンパク質のある程度決まった特定の糖鎖構造さえ認識できればよいと考えられる。つまり、前者は外来性リガンド(exogenous ligand)に対するASGP-R、後者は内因性リガンド(endogenous ligand)に対するASGP-Rと言えるかもしれない。

最近、ラットにおける異系心臓移植後の拒絶反応時に、浸潤してくるマクロファージにM-ASGP-BPが高発現しているとの報告がある(79)。また、その発現誘導には活性化リンパ球との相互作用も必要であるようであった。実際、M-ASGP-BPがマクロファージの浸潤マーカーとして意味を持つのかどうかはわからないが、糖結合特異性とマクロファージの生理的機能との関係については更なる今後の研究に期待する。

## 実験方法 (第3章)

### 1、試薬

アシアロオロソムコイド(ASOR)は、アメリカ赤十字社の M.Wickerhauser 博士より恵与されたOR より 1章の実験方法の通りに調製した(7)。Sodium [ $^{125}$ I] iodide (carrier-free) はAmersham Corp. から購入した。以下の合成糖リガンドは、Johns Hopkins 大学生物学部 Lee, Y.C.教授らによって合成された。牛血清アルブミン(BSA) 1分子あたりに平均  $n$  残基の糖を、BSAのアミノ基に対してSugar-S-CH<sub>2</sub>C(=NH)NH-で結合させたネオ糖タンパク質、Gal<sub>n</sub>-AI-BSAおよび GalNAc<sub>n</sub>-AI-BSAは(80)に述べられているように作製した。6-(trifluoroacetamido)hexyl  $\beta$ -D-galactopyranoside (Gal-AH-TFA)

6-(trifluoroacetamido)hexyl 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-galactopyranoside (GalNAc-AH-TFA) の合成は(81, 82)を参照。D(LacAH)<sub>2</sub>, D(G-LacAH)<sub>2</sub>, NAcYD(GG-LacAH)<sub>2</sub>, NAcYD(GGG-LacAH)<sub>2</sub>, NAcYD(G-GalNAcAH)<sub>2</sub>, YEE(LacAH)<sub>3</sub>, YEE(GalNAcAH)<sub>3</sub>, tris-LacAHT, di-tris-Lac 以上のクラスターリガンドの合成は(66, 67, 69)を参照。

これらの低分子リガンドにおいて、D, E, G, Yは1文字アミノ酸表記でそれぞれAsp, Glu, Gly, Tyr (L 体) を表す。最初の5個の2価リガンドは、Asp のカルボキシル基に  $\omega$ -アミノ基を含む糖が接続して組み立てられている。 $\omega$ -アミノ基を含む糖は 6-aminohexyl  $\beta$ -glycoside で、lactoseの時 LacAH またはGalNAcの時 GalNAcAH とする。それらの長腕誘導体には1~3個のグリシンを連結させた。同様に、3価リガンドは tyrosyl- $\gamma$ -glutamylglutamic acid (YEE)の3個のカルボキシル基に LacAH または GalNAcAHを連結させて作製した。クラスターリガンドの構造はFig. 3-5 に示してある。TAGP は、Fig.3-5 に示すように3個の末端 Gal残基をもつ特定の構造をした3本鎖糖ペプチドであり、牛フェツイン(fetuin)から調製した(83)。

### 2、細胞培養とDNAトランスフェクション

Hep G2 細胞 (American Type Culture Collectionから購入) および COS-1 細胞 (Japanese Cancer Research Resources Bank (Tokyo) から恵与)は、10% fetal calf serum (GIBCO) を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (日水製薬) 中、CO<sub>2</sub> incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) にて培養した (35-mm well)。発現ベクター pdKCR-M-ASGP-BP は、1章と同様の方法でトランスフェクションに使用した(11)。

### 3、 $^{125}\text{I}$ -ASOR 結合阻害実験

ASORはGreenwood らのchloramine-T 法によりヨードラベルした (45)。トランスフェクション後60時間のCOS-1 細胞およびHep G2 細胞 ( $1 \times 10^5$ /35mm well)に対して 阻害実験を行った。4°C、10分間細胞をpreincubation した後、種々の阻害物存在下、10 nMの $^{125}\text{I}$ -ASOR と4°C、1時間 incubation した。次にPBS 1ml で3 回洗浄し、各well に1ml の0.1M-NaOH を加え、細胞を溶解し結合放射活性をBeckman  $\gamma$ -5000 counter にて測定した。非特異的結合は100 モル過剰のラベルしていないASORまたは 5mM EDTA存在下決定した。control binding は阻害物非存在下で同じ条件のもと測定した。 $^{125}\text{I}$ -ASOR のレクチンへの結合を50%阻害する阻害物濃度を $I_{50}$ とした。

## 結論

著者は、ラット腹腔マクロファージレクチン (M-ASGP-BP)の培養細胞における高発現系を確立し、それを用いることでレクチンの構造と機能に関する研究を行い、以下のような知見を得た。

- 1、発現させた組み換えM-ASGP-BP (rM-ASGP-BP) に関して、そのアシアロオロソムコイド (ASOR) に対する結合親和性、糖結合特異性、抗 RHL抗血清に対する免疫化学的反応性、糖タンパク質・ポリペプチド鎖・オリゴマー構造としての分子量などがマクロファージレクチンと一致していたことから、単離したcDNA は真にM-ASGP-BP をコードしていることを証明した。
- 2、アシアロ糖タンパク質レセプター(ASGP-R)としての肝レクチンは、その機能発現に2種類のサブユニットを必要とするのに対して、マクロファージレクチンはホモオリゴマー構造でASGP-Rとして機能することができることを証明した。
- 3、シンプルな構造であるM-ASGP-BP は、エンドサイトーシス型レセプターのプロトタイプであり、本レクチンの発現系は、糖特異的エンドサイトーシスの機能解析モデルとして有用であると考えられた。
- 4、エンドサイトーシス型レセプターとしてM-ASGP-BP が細胞内に移行する際のシグナル(*internalization signal*)として、細胞内領域のチロシン (Tyr-5) が重要な役割を果たしていることを明らかにした。
- 5、このTyr-5の働きはフェニルアラニンによって大部分代用されたことから、細胞内移行シグナルとしての機能には構造的に芳香族アミノ酸が重要であると推定した。
- 6、レセプターの急速なinternalization のために、Tyr-5のシグナルはM-ASGP-BP の6量体モデルにおいては半分以上のサブユニットに必要であると推定した。
- 7、Tyr-5はリン酸化されることから、細胞内移行シグナルとしての役割以外にエンドサイトーシスにおけるチロシンリン酸化酵素活性の関与が推定された。

8、本来 Gal /GalNAc 特異的であると考えられてきた2種類のレクチンについて、両レクチンは共に多価リガンドに強い親和性をもつクラスター効果を示したが、肝レクチンはGalNAcの方に、M-ASGP-BPはGalの方により特異的であることを明らかにした。

9、肝レクチンは、血清型糖タンパク質がもつ特定の3本鎖型糖鎖構造にきわめて高い親和性を示すが、M-ASGP-BPの場合にはそのような構造が見いだせず、両者の糖結合部位の配置には差があり糖鎖認識様式が異なっていることを明らかにした。

これらの研究成果は、マクロファージレクチンの構造と機能との関連について初めて明らかにしただけでなく、糖特異的エンドサイトーシスのメカニズムの解明に寄与するものである。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を与えていただき、終始御指導・御鞭撻を賜りました京都大学薬学部川寄敏祐教授に深く感謝致します。

また、多くの貴重な御助言を賜りました京都大学薬学部伊藤信行教授に心から感謝の意を表します。

更に、日米双方で実験の御指導と有益な御助言を賜りました Johns Hopkins 大学生物学部 Yuan C. Lee 教授、 Reiko T. Lee 博士に心から感謝いたします。

また、種々の御助言を賜りました京都大学薬学部小堤保則助教授、岡昌吾博士、武田薬品工業株式会社伊井雅幸博士、第1章に御協力を頂いた大阪バイオサイエンス西沢幹雄博士、ならびに本研究に御協力を頂いた京都大学薬学部生物化学教室の方々に心から感謝致します。

## 引用文献

- 1, 日経サイエンス 23 No.4 16-55 (1993)
- 2, Ashwell, G. *Advan Enzymol.* 41 99-128 (1974)
- 3, Stadalnik, R. C., Vera, D.R., & Woodle, E. S. *J. Nucl. Med.* 26 1233-1242 (1985)
- 4, Kudo, M., Vera, D. R., & Stadalnik, R. C. in *Neoglycoconjugates : Preparation and Applications*, ( Lee, Y. C., and Lee, R. T. eds), Academic Press, New York, 373-402 (1994)
- 5, Kuhlenschmidt, T. B., & Lee, Y. C. *Biochemistry* 23 3569-3575 (1984)
- 6, Mizuno, Y., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., & Yamashina, I. *J. Biol. Chem.* 256, 4247-4252 (1981)
- 7, Kawasaki, T., Etoh, R., & Yamashina, I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 1018-1024 (1978)
- 8, Kozutsumi, Y. Kawasaki, T., & Yamashina, I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 658-664 (1980)
- 9, Kawasaki, T., Ii, M., Kozutsumi, Y., & Yamashina, I. *Carbohydr. Res.* 151, 197-206 (1986)
- 10, Ii, M., Kurata, H., Itoh, N., Yamashina, I. & Kawasaki, T. *J. Biol. Chem.* 265, 11295-11298 (1990)
- 11, **Ozaki, K.**, Ii, M., Itoh, N., & Kawasaki, T. *J. Biol. Chem.* 267, 9229-9235 (1992)
- 12, McPhaul, M., & Berg, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 8863-8867 (1986)
- 13, Shia, M. A. & Lodish, H. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 1158-1162 (1989)
- 14, Collawn, J. F., Stangel, M., Kuhn, L. A., Esekogwu, V., Jing, S., Trowbridge, I. S. & Tainer, J. A. *Cell* 63 , 1061-1072 (1991)
- 15, **Ozaki, K.**, Itoh, N., & Kawasaki, T. *J. Biochem.* 113, 271-276 (1993)
- 16, **Ozaki, K.**, Lee, R.T., Lee, Y.C., & Kawasaki, T. *Glycoconj. J.* in press (1995)
- 17, Ii, M., Kawasaki, T., & Yamashina, I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 720-725 (1988)
- 18, O' Hare, K., Benoist, C., & Breathnach, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 1527-1531 (1981)



- 19, Fukunaga, R., Sakawa, Y., & Nagata, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 5086-5090 (1984)
- 20, Chen, C., & Okayama, H. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2745-2752 (1987)
- 21, Gorman, C. in *DNA Cloning* (Glover, D. M., ed) Vol. 2, pp143-190, IRL Press Oxford (1985)
- 22, Ii, M., Wada, M., Kawasaki, T., & Yamashina, I. *J. Biochem.* 104, 587-590 (1988)
- 23, Schwartz, A. L., Fridovich, S. E., Knowles, B. B., & Lodish, H. F. *J. Biol. Chem.* 256, 8878-8881 (1981)
- 24, Harford, J., Bridges, K., Ashwell, G., & Klaunsner, R. D. *J. Biol. Chem.* 258, 3191-3197 (1983)
- 25, Baenziger, J. U. & Fiete, D. *Cell* 22, 611-620 (1980)
- 26, Wong, T. C., Townsend, R.R., and Lee, Y. C. *Carbohydr. Res.* 170, 27-46 (1987)
- 27, Lee, R. T. *Biochemistry* 21, 1045-1050 (1982)
- 28, Breitfeld, P. P., Rup, D., & Schwartz, A. L. *J. Biol. Chem.* 259, 10414-10421 (1984)
- 29, Helenius, A., and Simons, K. *Biochim. Biophys. Acta* 415, 29-79 (1975)
- 30, Landschulz, W. H., Johnson, P. F., & Mcknight, S. L. *Science* 240, 1759-1764 (1988)
- 31, Beavil, A. J., Edmeades, R. L., Gould, H. J., and Sutton, B. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 753-757, (1992)
- 32, Kawasaki, T., & Ashwell, G. *J. Biol. Chem.* 251, 1296-1302 (1976)
- 33, Drickamer, K., Mamon, J. F., Binns, G., & Leung, J. O. *J. Biol. Chem.* 259, 770-778 (1984)
- 34, Hong, W., Le, A. V., & Doyle, D. *Hepatology* 8, 553-558
- 35, Bishoff, J., & Lodish, H. F. *J. Biol. Chem.* 262, 11825-11832 (1987)
- 36, Halberg, D. F., Wagner, R. E., Farrell, D.C., Hildreth, IV. J., Quesenberry, M. S., Loeb, J. A., Holland, E. C., & Drickamer, K. *J. Biol. Chem.* 262, 9828-9838 (1987)
- 37, Sawyer, J. T., Sanford, J. P., & Doyle, D. *J. Biol. Chem.* 263, 10534-10538
- 38, Lee, Y. C., Townsend, R. R., Hardy, M. R., Lonngren, J., Arnarp, J., Haraldsson, M., & Lonn, H. *J. Biol. Chem.* 258, 199-202 (1983)
- 39, Rice, K. G., Weisz, O. A., Barthel, T., Lee, R.T., & Lee, Y. C. *J. Biol. Chem.* 265, 18429-18434 (1990)

- 40, Braiterman, L. T., Chance, S. C., Porter, W. R., Lee, Y. C., Townsend, R. R., & Hubbard, A.L. *J. Biol. Chem.* 264, 1682-1688 (1989)
- 41, Ashwell, G., & Harford, J. *Annu. Rev. Biochem.* 51, 531-554 (1982)
- 42, Schauer, R., Fischer, C., Lee, H., Ruch, B., & Kelm, S. *Lectins and Glycoconjugates in Oncology*, pp. 5-23, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg (1988)
- 43, Lee, Y. C. & Ballou, C. E. *Biochemistry* 4, 257-264 (1965)
- 44, Mackett, M., Smith, G. L., & Moss, B. in *DNA Cloning* (Glover, D. M., ed) Vol. 2, pp. 209-211, IRL Press, Oxford (1985)
- 45, Greenwood, F. C., Hunter, W. M., & Glover, J. S. *Biochem. J.* 89, 114-123 (1963)
- 46, Schwartz, A. L., Rup, D., & Lodish, H. F. *J. Biol. Chem.* 255, 9033-9036
- 47, Schwartz, A. L., Fridovich, S. E., & Lodish, H. F. *J. Biol. Chem.* 257, 4230-4237 (1983)
- 48, Laemmli, U. K. *Nature* 227, 680-685 (1970)
- 49, Pearse, B. M. F. & Robinson, M. S. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 151-171 (1990)
- 50, Tamura, S., Brown, T. A., Dubler, R. E., & Lerner, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 80-86 (1983)
- 51, Collawn, J. F., Stangel, M., Kuhn, L. A., Esekogwu, V., Jing, S., Trowbridge, I. S., & Tainer, J. A. *Cell* 63, 1061-1072 (1990)
- 52, Lobel, P., Fujimoto, K., Te, R. D., Griffiths, G., & Kornfeld, S. *Cell* 57, 787-796 (1989)
- 53, Breitfeld, P. P., Casanova, J. E., Mckinnon, W. C., & Mostov, K. E. *J. Biol. Chem.* 265, 13750-13757 (1990)
- 54, Peters, C., Braun, M., Weber, B., Wendland, M., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A., & Von Figura, K. *EMBO. J.* 9, 3497-3506 (1990)
- 55, Williams, M. A. & Fukuda, M. *J. Cell. Biol.* 111, 955-966 (1990)
- 56, Lazarovits, J., & Roth, M. *Cell* 53, 743-752 (1988)
- 57, Ktistakis, N. T., Thomas, D., & Roth, M. G. *J. Cell. Biol.* 111, 1393-1407 (1990)
- 58, Geffen, I., Wessels, H. P., Roth, J., Shia, M. A., & Spiess, M. *EMBO. J.* 8, 2855-2862 (1989)

- 59, Fuhrer, C., Geffen, I., & Spiess, M. *J. Cell. Biol.* 114, 423-431 (1991)
- 60, Sato, M., Kawakami, K., Osawa, T., & Toyoshima, S. *J. Biochem.* 111, 331-336
- 61, Fallon, R. J., Danaher, M., Saylor, R. L., & Saxena, A. *J. Biol. Chem.* 269, 11011-11017 (1994)
- 62, Carpeniter, J. L., Paccaud, J. P., Baecker, J., Gibert, A., Orci, L. M., & Kahn, C. R. *J. Cell. Biol.* 122, 1243-1252 (1993)
- 63, Fallon, R. J., Danaher, M., & Saxena, A. *J. Biol. Chem.* 269, 26626-26629 (1994)
- 64, Kunkel, T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 488-492 (1985)
- 65, Lee, Y. C. in *Carbohydrate Recognition in Cellular Function* (Ciba Foundation Symposium 145) pp. 80-95, John Wiley & Sons, New York (1989)
- 66, Lee, R. T., Lin, P., & Lee, Y. C. *Biochemistry* 23, 4255-4268 (1984)
- 67, Lee, R. T., & Lee, Y. C. *Glycoconj. J.* 4, 317-328 (1987)
- 68, Lee, R. T., Rice, K. G., Rao, N. B. N., Ichikawa, Y., Barthel, T., Piskarev, V., & Lee, Y. C. *Biochemistry* 28, 8351-8358 (1989)
- 69, Lee, Y. C. *Carbohydr. Res.* 67, 509-514 (1978)
- 70, Lee, R. T. in *Liver Diseases* (Wu, G. Y., & Wu, C. H. eds), pp. 65-86, Marcel Dekker Inc, New York (1990)
- 71, Andersen, T. T., Freytag, J. W., & Hill, R. L. *J. Biol. Chem.* 257, 8036-8041 (1982)
- 72, Loeb, J. A., & Drickamer *J. Biol. Chem.* 262, 3022-3029 (1987)
- 73, Lee, R. T., & Lee, Y. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 1444-1451 (1988)
- 74, Hardy, M. R., Townsend, R. R., Parkhurst, S. M., & Lee, Y. C. *Biochemistry* 24, 22-28 (1985)
- 75, Spiess, M., & Lodish, H. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 6465-6469 (1985)
- 76, Lee, Y. C., Townsend, R. R., Hardy, M. R., Lönngren, J., & Bock, K. in *Biochemical and Biophysical Studies of Proteins and Nucleic Acids* (Lo, T. B., Lin, T. Y., & Li, C. H., eds) 349-360, Elsevier, New York (1984)
- 77, Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, T., & Yamashina, I. *J. Biol. Chem.* 262, 7451-7454 (1987)
- 78, Ohta, M., Okada, M., Yamashina, I., & Kawasaki, T. *J. Biol. Chem.* 265, 1980-1984 (1990)

- 79, Russell, M. E., Utans, U, Wallace, A. F., Liang, P., Arceci, R. J., Karnovsky, M. J., Wyner, L. R., Yamashita, Y., & Tarn C. *J. Clin. Invest.* 94, 722-730 (1994)
- 80, Lee, Y. C., Stowell, C. P., & Krantz, M. J. *Biochemistry* 15, 3956-3963 (1976)
- 81, Weigel, P. H., Naoi, M., Roseman, S., & Lee, Y. C. *Carbohydr. Res.* 70, 83-91 (1979)
- 82, Lee, R. T., Wong, T. C., & Lee, Y. C. *J. Carbohydr. Chem.* 5, 343-357 (1986)
- 83, Rice, K. G., Rao, N. B. N., & Lee, Y. C. *Anal. Biochem.* 184, 249-258 (1990)